

ACADÉMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

ETUDE DE QUELQUES MODELES DE REACTEURS ENZYMATIQUES CONTINUS

THESE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de Docteur-Ingénieur

par

Joseph BOUDRANT

Ingénieur E.N.S.I.A.

Assistant à

l'Université des Sciences et Techniques

Soutenue le 26 Juin 1973 devant la commission d'examen

JURY :	M ^{me}	H. COLSON-GUASTALLA,	Président
	MM.	G. DURAND, J.-M. MORETTI, C. CHEFTEL,	} Assesseurs

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548320_0019

ACADÉMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

ETUDE DE QUELQUES MODELES DE REACTEURS ENZYMATIQUES CONTINUS

THESE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de Docteur-Ingénieur

par

Joseph BOUDRANT

Ingénieur E.N.S.I.A.

Assistant à

l'Université des Sciences et Techniques

Soutenue le 26 Juin 1973 devant la commission d'examen

JURY :	M ^{ms}	H. COLSON-GUASTALLA,	Président
	MM.	G. DURAND, J.-M. MORETTI, C. CHEFTEL,	} Assesseurs

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU QUÉBEC
ACADÉMIE DE MONTREAL

DE REACTEURS ENZYMATIQUES CONTINUUS ETUDE DE QUELQUES MODELES

THÈSE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Québec
pour obtenir le grade de Docteur en Chimie



LIBRARY

Leiden, Holland

January 1971

Received from the author

Exemplaire de la thèse déposée à la bibliothèque de l'Université

UNIVERSITY OF LEIDEN LIBRARY

MAINTENANCE

1. M. W. J. VAN

2. G. J. VAN

LISTE DES PROFESSEURS
DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DU LANGUEDOC

PRESIDENT : J. ROUZAUD

Vice-Présidents : B. CHARLES - G. SAUMADE.

Doyens honoraires de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc :

P. MATHIAS
 B. CHARLES
 A. CASADEVALL

Professeurs honoraires de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc :

J. JACQUES	G. DENIZOT	M. MOUSSERON
M. CASTERAS	J. GRANIER	P. CHATELAIN
E. CARRIERE	Ch. BOUHET	A.M. VERGNOUX
E. TURRIERE	J. MOTTE	C. CAUQUIL
J. SALVINIEN		

Secrétaire Général : E. SIAU

Professeurs Titulaires :

M.	J.P. ROIG	Physique
Mlle	O. TUZET	Zoologie
M.	G. COUCHET	Mécanique Supérieure
M.	J. AVIAS	Géologie
M.	P. VIELES	Chimie
M.	R. MAURY (I.P.A.)	Droit
M.	E. KAHANE	Chimie Biologique
M.	J.J. MOREAU	Mécanique Ration- nelle
M.	B. CHARLES	Mathématiques Pures
M.	R. JOUTY	Physique

II

M.	P. DUMONTET	Physique
M.	R. LEGENDRE	Zoologie
M.	I. ASSENMACHER.....	Physiologie Animale
M.	B. PISTOULET	Physique
M.	Ch. ROUMIEU	Analyse Supérieure
M.	J. ROBIN	Physique
M.	A. POTIER	Chimie Minérale
M.	R. LAFONT	Physique
M.	R. JACQUIER	Chimie
M.	J. FALGUEIRETTES	Minéralogie
M.	J. REGNIER	Chimie
Mme	J. CHARLES	Mathématiques
M.	P. CAILLON	Physique
M.	J. ROUZAUD	Chimie
M.	Ch. SAUVAGE	Botanique
M.	H. CHRISTOL (E.N.S.I.)	Chimie
Mme	G. VERNET	Biologie Animale
M.	L. CECCHI	Physique
M.	H. ANDRILLAT	Astronomie
M.	M. SAVELLI	Physique
M.	M. MATTAUER	Géologie
M.	L. EUZET	Zoologie
M.	C. DELOUPY	Physique
M.	L. GRAMBAST	Botanique
M.	A. BONNET	Botanique
M.	G. LAMATY	Chimie
M.	R. MARTY	Psychophysiologie
Mme	S. ROBIN	Physique
M.	R. CORRIU (I.U.T.)	Chimie
Mme	N. PARIS	Physiologie Végétale
M.	J. ZARZYCKI	Sciences des Matériaux (Physique du Solide)
M.	S. GROMB	Chimie Physique
M.	F. SCHUE	Chimie Organique
M.	M. MAURIN	Chimie Minérale

III

M.	P. SABATIER	Mathématiques
M.	L. THALER	Paléontologie

Professeurs sans chaires :

M.	G. TOURNE	Chimie
M.	J. REMY	Géologie
M.	P. DEMANGEON	Géologie
M.	E. GROUBERT	Physique
Mme	E. GUASTALLA	Biologie Physico-Chimique
M.	R. LENEL	Biologie Animale
M.	F. PROUST	Géologie
M.	A. BASSOMPIERRE	Physique
M.	N. ROBY	Mathématiques
M.	R. GAUFRES	Chimie
M.	J. PARIS	Zoologie
M.	G. BOUGNOT	Physique
M.	M. ROUZEYRE	Physique
M.	P. MOLINO	Mathématiques
M.	J. LEGRAND	Physiologie Animale
M.	R. JONARD	Botanique
M.	R. CANO (I.U.T.)	Mesures Physiques
M.	J.P. FILLARD (I.U.T. - NIMES)	Génie Electrique
M.	J.M. MORETTI	Biochimie
M.	J.L. IMBACH	Chimie
M.	C. GOUT	Physique
M.	H. MATHIEU	E.E.A. Electronique
M.	C. DURANTE	Automatique

Professeurs Associés :

M.	E. AKUTOWICZ	Mathématiques
M.	A. MICALI	Mathématiques
M.	C. VAGO	Biologie Animale
M.	L. DAUZIER	Physiologie Animale
M.	R. GILLESPIE	Chimie

Maîtres de Conférences :

M.	G. LOUPIAS	Mathématiques
M.	Ch. CASTAING	Mathématiques
M.	J.D. BAYLE	Physiologie Animale
M.	R. HAKIM	Mathématiques
Mme	M. HAKIM	Mathématiques
M.	F.HALLE	Biologie Végétale
M.	G. MASCHERPA.....	Chimie
M.	F. LAPSCHER	Mathématiques
M.	J. GARCIA (I.U.T.)	Génie Mécanique
M.	M. DENIZOT	Biologie Végétale
M.	B. BRUN	Chimie Physique
M.	L. GIRAL	Chimie Organique
M.	L. LASSABATERE (I.U.T.)	Mesures Physiques
M.	J.P. TRILLES (I.U.T.)	Biologie Appliquée
M.	G. LECOY (I.U.T.)	Génie Electrique
M.	G. BORDURE (I.U.T.)	Génie Electrique
M.	Y. PIETRASANTA (E.N.S.I.)	Chimie Appliquée
M.	M. AMANIEU (Sciences et Techniques)	Hydrologie et Mariculture
M.	J. CROUZET (Sciences et Techniques)	Biochimie Appliquée
M.	A. COMMEYRAS	Chimie Organique
M.	J.L. ROBERT (I.U.T. - NIMES)	Génie Electrique
M.	P. LOUIS	Géophysique Appliquée
Mlle	M. LEVY (I.U.T)	Chimie
M.	J. LAGARRIGUE (I.U.T.)	Biologie Appliquée
M.	Cl. DROGUE (Sciences et Techniques)	Hydrogéologie
M.	P. GENESTE (E.N.S.I.).....	Chimie Physique Appliquée
M.	J. CHEFTEL (Sciences et Techniques)	Biochimie Appliquée à l'alimentation
M.	M. AVEROUS (I.U.T. - NIMES)	Génie Electrique
M.	B. LEMAIRE (Sciences et Techniques)	Mathématiques Appli- quées Informatique
M.	M. VALADIER	Mathématiques
M.	O. MAISONNEUVE (I.U.T.)	Informatique

M.	P. DELORD	Physique
M.	M. GODRON	Ecologie Végétale

Maîtres de Conférences associés :

M.	Y. CORMARY	Géologie
M.	C. MAURIN	Biologie Animale
M.	P. JOUANNA (I.U.T.)	Génie Civil

Chargés d'Enseignement :

M.	M. LEFRANC	Mathématiques
M.	Y. ESCOUFFIER (I.U.T.)	Informatique
M.	B. FILLIATRE	Informatique
M.	Y. CESARI (I.U.T.)	Informatique
M.	P. BESANCON	Physiologie de la nutrition appliquée à l'alimentation
M.	R. BEN AIM	Génie Chimique et traitement des eaux

Chargés de Fonctions de maîtres de Conférences :

M.	G. SAUMADE (I.U.T.)
----	---------------------

Chargés de Cours :

M.	J. GUIN - (I.P.A.)
M.	Cl. PEROCHON - (I.U.T.)
M.	M. MOUTON - (I.U.T.)

Ce travail a été effectué sous la direction de Monsieur le Professeur DIEFTEL, à qui j'exprime ma profonde gratitude.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Madame le Professeur COLSON-GUASTALLA en ayant bien voulu accepter la présidence du Jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur DURAND et Monsieur le Professeur MORETTI d'avoir accepté de juger ce travail.

INTRODUCTION GENERALE

L'utilisation d'enzymes pour catalyser des réactions d'intérêt industriel présente certains avantages par rapport aux procédés relevant de la chimie organique et de la microbiologie appliquée :

- Simplicité de l'équipement et des opérations qui peuvent éventuellement être faites en milieu stérile, après filtration des solutions enzymatiques ;
- Spécificité de la catalyse ;
- Rapidité, même dans des conditions modérées ;
- Possibilité de réactions continues, en plusieurs étapes, si nécessaire.

Les désavantages principaux des enzymes sont liés à leur instabilité et à leur prix. L'éventuelle nécessité de coenzyme et le caractère réversible des réactions catalysés par les enzymes peuvent aussi présenter des problèmes.

L'amélioration récente des techniques de production économique de diverses enzymes microbiennes par fermentation (DEMAIN, 1971 ; CHARM et MATTEU, 1971), la découverte de nouvelles méthodes de purification par chromatographie d'affinité (CUATRECASAS, 1971), la possibilité de fixer les enzymes par différents procédés (GRYSKIEWICZ, 1971) et de les réutiliser, marquent la naissance de la technologie enzymatique. Dès lors, il est possible d'envisager l'emploi industriel des enzymes pour la catalyse de nombreuses réactions (FAITH et coll., 1971). Ces catalyseurs biologiques peuvent être utilisés dans divers types de réacteurs discontinus ou continus que l'on qualifie de "bio-chimiques" (LILLY et DUNNILL, 1971).

Les applications potentielles vont du traitement des maladies héréditaires à l'épuration d'effluents industriels. La majeure partie des applications actuelles concernent la technologie alimentaire. (WIELAND, 1972 ; REID, 1971).

Les principaux modes de fixation d'enzymes sur des supports insolubles sont les suivants :

1) Adsorption physique :

La liaison ainsi formée entre l'enzyme et le support est réversible. En conséquence, la perte d'activité enzymatique par désorption peut être importante. Lorsque le support est une résine échangeuse d'ions, les propriétés polyélectrolytiques des protéines peuvent renforcer l'adsorption entre l'enzyme et le support. L'adsorption n'est cependant efficace que dans certains intervalles de pH et de force ionique.

2) Formation de liaisons covalentes entre enzyme et support :

Le support est activé par introduction d'un groupement chimique capable de réagir avec les groupements aminés, hydroxyles ou carbonyles libres des enzymes. Le groupe actif du support fixé sur le support peut être soit un groupement azide (MITZ et SUMMARIA, 1961), diazo (ENZACHYL), isothiocyanate (AXEN et PORATH, 1966) et triazinyl (KAY et CROOK, 1967).

3) Réticulation des molécules d'enzyme :

Les molécules d'enzyme sont réticulées entre elles par des liaisons covalentes transversales réalisées à l'aide de réactifs multifonctionnels. Il y a alors formation d'un réseau tridimensionnel. Les agents multifonctionnels utilisés peuvent être le glutaraldéhyde (AVRAMEAU et coll., 1968), l'acide bis-diazobenzidine-2,2'-disulphonique (GOLDMAN et coll., 1968). SILMAN et KATCHALSKI (1965) mentionnent d'autres réactifs qui peuvent être également utilisés.

4) Inclusion de l'enzyme dans un support réticulé :

Les molécules d'enzyme peuvent être immobilisées de façon irréversible par inclusion dans un gel fortement réticulé. Celui-ci peut être un gel de polyacrylamide (HICKS et UPDIKE, 1966), de dextrans (CHAPPELLE et coll., 1967) ou d'amidon (GUILBAULT et KRAMER, 1965), ou encore des membranes semi-perméables (CHANG, 1964).

Certaines méthodes font d'ailleurs simultanément appel à plusieurs des modes de fixation mentionnés ci-dessus.

La fixation d'une enzyme sur un support insoluble peut lui faire perdre une partie de son activité (GOLSTYIN et KATCHALSKI, 1968), probablement dans la mesure où la fixation modifie parfois le centre actif, et en raison de l'encombrement stérique dû au support. Dans certains cas, la

fixation peut cependant conférer à l'enzyme l'avantage d'une plus grande stabilité vis-à-vis des agents dénaturants (chaleur en particulier) (BROUN et coll., 1969) ou protéolytiques.

Mais c'est surtout la facilité de la séparation enzyme-produits en fin de réaction ou lors d'opérations continues, qui constitue l'intérêt des enzymes fixées, puisqu'elle permet la réutilisation prolongée de ces dernières (LACHMANN, 1972).

L'ensemble des notions concernant la technologie enzymatique ne recouvre qu'une partie du génie biochimique, dont AIBA et coll. (1965) ont donné la définition suivante : "Le génie biochimique est l'étude de procédés économiques utilisant des matériaux d'origine ou de caractère biologique à des fins préparatives. La fonction de l'ingénieur biochimiste est d'utiliser les connaissances du microbiologiste et du biochimiste pour des opérations d'intérêt industriel. Pour ce faire, celui-ci doit non seulement avoir de solides bases en sciences biologiques mais également en génie chimique".

Ainsi la technologie enzymatique vise à supplanter des procédés de fabrication ou de transformation moins économiques. Le développement industriel de nouveaux procédés fait appel à l'ensemble des notions que recouvre le génie chimique (LE GOFF, 1968). Il nécessite une expérimentation effectuée à l'échelle du laboratoire et comportant notamment le calcul des divers types de réacteurs. Ce calcul fait intervenir l'influence des phénomènes physiques, tels que le temps de résidence de la solution dans le réacteur, l'apport des produits par convection ou par diffusion, l'intermélangeage des réactifs, l'évacuation de la chaleur. La connaissance de ces phénomènes de cinétique physique, combinée à celle de la cinétique de réaction permet de prévoir les performances des réacteurs, taux de conversion notamment (LEVENSPIEL, 1961). Le passage à une échelle intermédiaire (atelier pilote) et au stade industriel font appel à d'autres bilans dans lesquels interviennent des facteurs économiques (optimisation).

En ce qui concerne les réacteurs biochimiques, les diverses études effectuées se sont attachées d'une part au calcul de leurs performances en fonction de la réaction chimique qui s'y déroule (LILLY et SHARP, 1967), et

d'autre part, à la comparaison de l'efficacité des divers types de réacteurs vis-à-vis d'une réaction donnée. Ainsi, lors de l'hydrolyse du maltose par l'amyloglucosidase, un réacteur tubulaire semble plus efficace qu'un réacteur continu homogène (O'NEILL et coll., 1971). On peut remarquer que si la plupart des systèmes ont été étudiés avec de faibles concentrations de substrat, certains auteurs (SMILEY, 1971) -hydrolyse continue de l'amidon à l'aide de glucoamylase immobilisée- ont cependant essayé de travailler dans des conditions plus proches des exigences industrielles.

Au cours du présent travail, nous avons réalisé et étudié divers modèles de réacteurs enzymatiques. Les calculs ont été abordés sous l'angle du bilan de matière et du transfert de matière. Le transfert de matière intervient en effet de façon non négligeable lorsque la réaction a lieu en phase hétérogène.

L'hydrolyse du saccharose par de l'invertase et l'oxydation du glucose en acide gluconique par de la glucose oxydase ont été choisies comme modèles de réaction d'intérêt industriel et étudiées dans des systèmes permettant une réaction continue.

L'hydrolyse du saccharose a été étudiée dans deux systèmes différents tant par le type de réacteur que par le mode de rétention de l'invertase. Cette étude a été faite dans des conditions de concentration élevée en saccharose.

L'oxydation du glucose a été étudiée dans un seul type de réacteur dans lequel la quantité d'enzyme utilisée est fixe mais non réutilisée.

L'exposé expérimental de notre travail est divisé en trois parties :

I - Hydrolyse continue du saccharose par de l'invertase retenue sous forme soluble dans un réacteur à membrane d'ultrafiltration.

II - Hydrolyse continue du saccharose par de l'invertase immobilisée par adsorption dans un réacteur tubulaire.

III - Oxydation continue du glucose par de la glucose oxydase et de la catalase.

MATERIELS ET METHODES

Réactifs :

L'invertase de levure (extrait lyophilisé), le saccharose "pour usages biochimiques" et le glucose "pour usages biochimiques" proviennent de Merck. Les expériences continues d'hydrolyse ont été faites avec du saccharose "très pur" Merck.

La δ -glucotactone provient de Fluka A.G.

La glucose oxydase purifiée d'*Aspergillus niger* (type II) et la Catalase de foie de boeuf (type C 10) proviennent de Sigma.

Le réactif "glucostat" (glucose oxydase, peroxydase, orthodianisidine) provient de Worthington Biochemical Corp.

Les supports utilisés sont des résines échangeuses d'ions Amberlite (type IR 120, IRC 50, IRA 410, IR 45, 200, IRA 900, IRA 93).

Le Sépharose 6B provient de Pharmacia.

L'azote (qualité U, 99,9 % de N_2) et l'oxygène proviennent de l'Air Liquide.

Les concentrations en saccharose sont exprimées en g pour 100 ml (%).

Les concentrations en glucose sont exprimées en concentration molaire (M).

Appareillage :

Expérience discontinues :

Les expériences discontinues avec les enzymes solubles ou adsorbées

ont été faites dans un réacteur à double enveloppe Radiometer (50 ml). Lors des expériences avec invertase adsorbée sur résine, l'agitation est telle que la répartition du catalyseur peut être considérée comme homogène.

Expériences continues sans rétention d'enzyme :

Des hydrolyses continues sans rétention d'enzyme ont été réalisées avec le réacteur Radiometer. Les solutions de substrat et d'invertase sont introduites à l'aide d'une pompe péristaltique Sigmamotor type T 8, (P. P.), qui permet de faire varier le débit. Le volume à l'intérieur du réacteur est maintenu constant à l'aide d'un trop plein (Figure 1).

Les oxydations continues de glucose sans rétention de glucose oxydase ont été faites à l'aide d'un réacteur à double enveloppe en acier inoxydable de capacité 800 ml. La pompe péristaltique Sigmamotor permet de faire varier le débit et de maintenir le niveau constant. L'apport d'oxygène est assuré par barbotage (débit d'oxygène : 1l/mn). Dans une série d'expériences, le pH a été maintenu constant à l'aide d'un pH mètre Radiometer type TTT 2 muni d'une autoburette Radiometer type ABU 11 (Figure 2).

Hydrolyses continues avec rétention d'enzyme :

Les hydrolyses continues du saccharose avec rétention d'enzyme ont été faites à l'aide d'une cellule d'ultrafiltration Amicon, modèle 52, de capacité 65 ml, munie d'un barreau aimanté (Figure 3). Les membranes Amicon type Diaflo ont une surface de $12,5 \text{ cm}^2$. La solution stock de saccharose est placée dans un réservoir inox Amicon type RS de capacité 4 litres. Cette solution pénètre de façon continue dans la cellule du fait de la pression d'azote (3 kg/cm^2), et au fur et à mesure que la solution de substrat plus ou moins hydrolysé présente dans la cellule passe au travers de la membrane d'ultrafiltration. La thermostatisation est assurée en plaçant la cellule dans un bain d'eau chaude.

Les hydrolyses continues de saccharose avec rétention d'enzyme fixée sur support insoluble ont été faites à l'aide d'un réacteur tubulaire constitué par une colonne chromatographique Pharmacia (type K 9/30) (Figure 4). Une double enveloppe a été ajoutée afin de pouvoir effectuer une régulation de

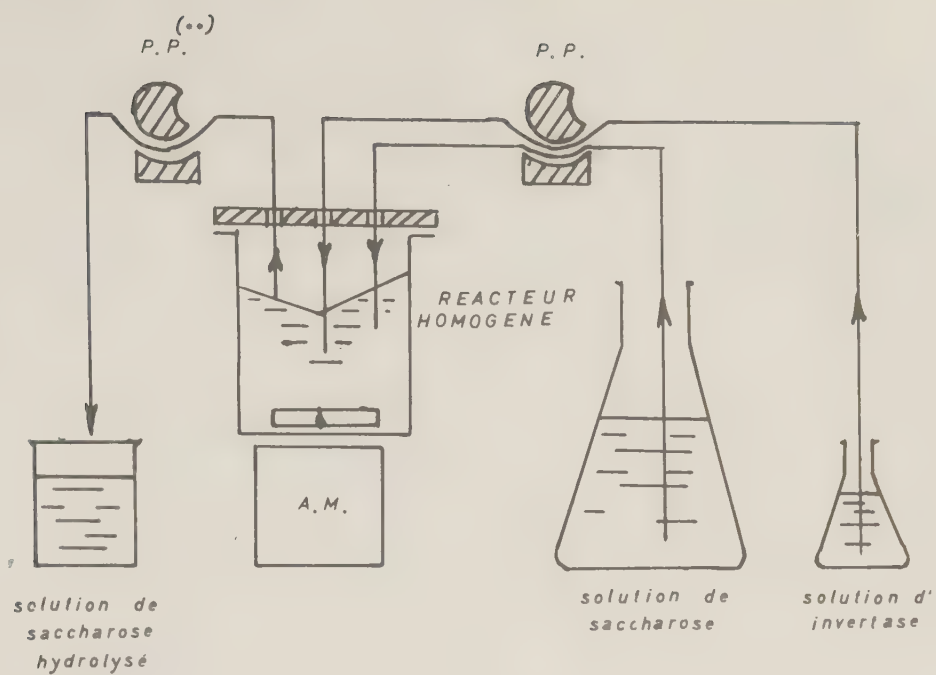


Figure 1

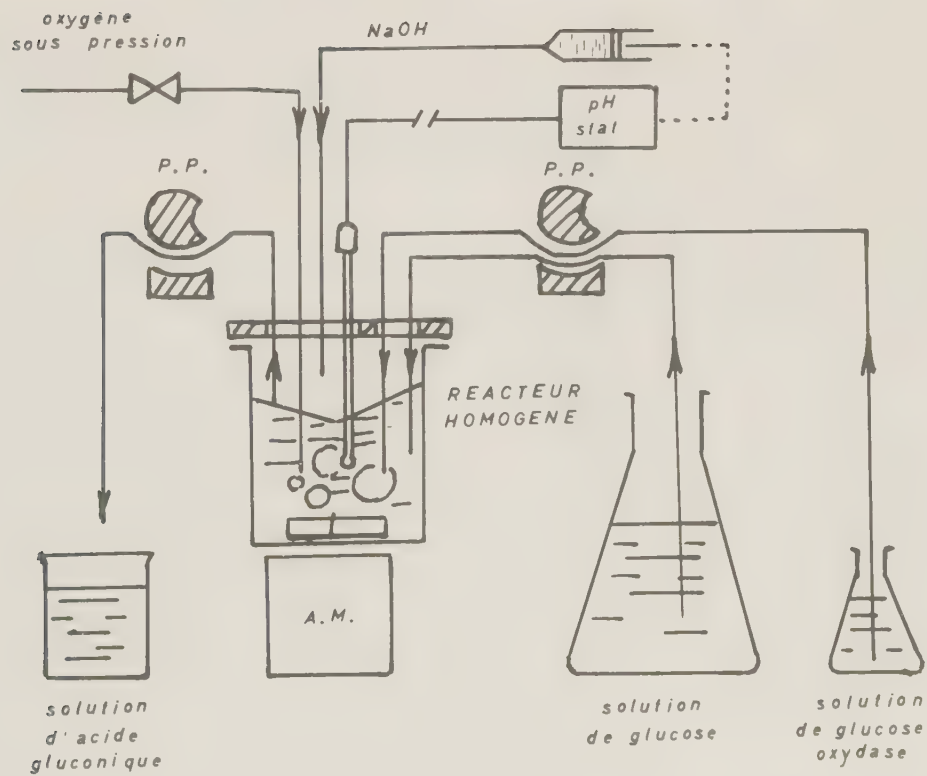


Figure 2

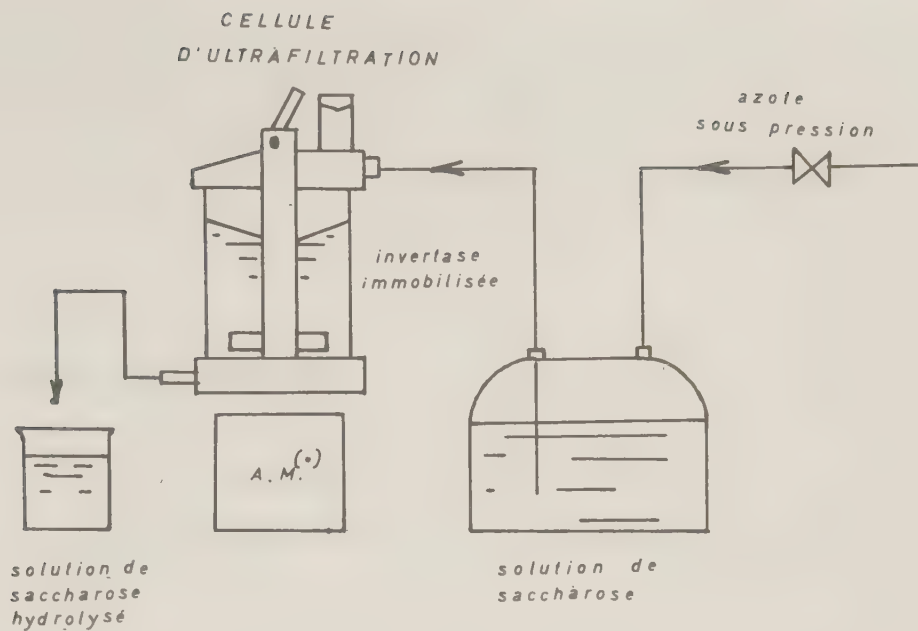


Figure 3

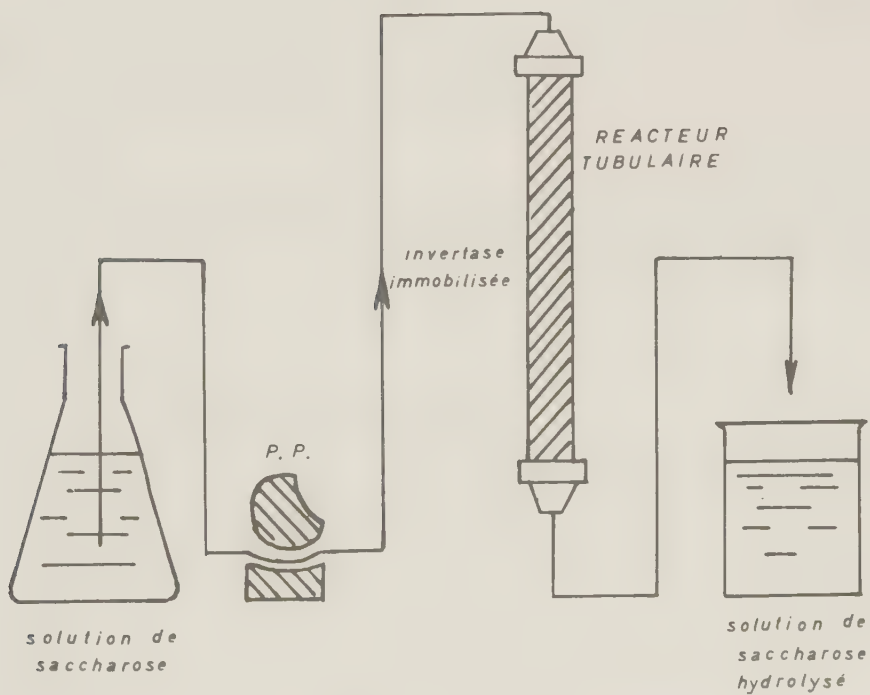


Figure 4

(*) A.M. = agitateur magnétique

(**) P.P. = pompe péristaltique

température. Les solutions de saccharose sont introduites de façon continue à l'aide de la pompe péristaltique. L'équilibre thermique est réalisé en amenant préalablement la température des solutions de saccharose à la température d'opération de la colonne. Ceci permet également d'éviter la formation de bulles dans la colonne.

Méthodes analytiques :

Milieu réactionnel :

L'hydrolyse du saccharose est faite en solution tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5.

L'oxydation du glucose est faite en solution tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 5,6.

Méthodes de dosage des sucres réducteurs :

L'hydrolyse du saccharose est suivie soit par dosage des groupements réducteurs libérés (FISHER et KOHES, 1951), soit par dosage du glucose à l'aide de la glucose oxydase.

Les mêmes méthodes permettent de mesurer la disparition du glucose par le dosage des groupements réducteurs restant lors de l'oxydation du glucose par la glucose oxydase.

Déterminations cinétiques :

Pour les études cinétiques, l'hydrolyse du saccharose par l'invertase est arrêtée par addition d'une solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium et refroidissement à 0°C. Afin d'exprimer l'activité enzymatique en tant que vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose (micromoles de saccharose hydrolysées par minute et dans les conditions expérimentales adoptées), nous avons tracé la courbe de début d'hydrolyse et déterminé la valeur de la pente à l'origine.

Afin d'étudier la cinétique d'oxydation du glucose par la glucose

oxydase, nous avons évalué la disparition du glucose en mesurant l'apparition d'acide gluconique : le pH est maintenu constant grâce à l'addition de solution d'hydroxyde de sodium : la quantité ajoutée est mesurée en fonction du temps et la pente initiale de la courbe obtenue donne directement l'activité enzymatique.

Méthodes de dosage d'invertase :

Deux méthodes de dosage ont été mises au point :

a) Afin d'évaluer la stabilité de l'invertase en présence des produits d'hydrolyse et également afin d'estimer la rétention de l'invertase par les membranes d'ultrafiltration, une méthode de dosage de cette enzyme a été mise au point. Un aliquot convenable de solution enzymatique est mélangé à 4 ml d'une solution de saccharose à 15 % dans le tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5. Après 4 minutes de réaction à 22°C, le taux d'hydrolyse doit être au maximum d'environ 20 %. Dans ces conditions, la quantité de sucres réducteurs formés est proportionnelle à la concentration d'enzyme. Lorsque la solution enzymatique contient déjà du glucose et du fructose, un témoin doit être effectué. L'activité enzymatique est exprimée comme indiqué précédemment.

b) Afin de doser l'invertase lors des expériences d'adsorption sur les résines échangeuses d'ions, nous avons mesuré la densité optique des solutions à 275 nm. En effet, la préparation enzymatique utilisée présente un pic d'absorption à cette longueur d'onde et nous avons vérifié par filtration sur gel de Sépharose 6B que la préparation était pure et que le pic d'absorption à 275 nm, enregistré sur les différentes fractions de l'éluat, correspond au pic d'activité mesuré sur ces fractions.

Mesures des viscosités :

Les mesures des viscosités sont faites à l'aide d'un viscosimètre à écoulement plongé dans un bain thermostaté. Le calcul des viscosités est fait par rapport à une solution de saccharose de viscosité connue.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I : HYDROLYSE CONTINUE DU SACCHAROSE PAR DE L'INVERTASE DE LEVURE RETENUE SOUS FORME SOLUBLE DANS UN REACTEUR A MEMBRANE D'ULTRAFILTRATION.

Ce système consiste principalement en un réacteur homogène limité par une membrane d'ultrafiltration. Le réacteur, qui contient une solution d'enzyme, est alimenté de façon continue en substrat. Le milieu réactionnel à l'intérieur est dans un état stationnaire et réparti de façon homogène grâce à l'agitation. La membrane d'ultrafiltration retient sélectivement les molécules d'enzyme mais laisse passer les molécules de faibles poids moléculaires, eau, produits de la réaction et substrat. Le temps de résidence nominal de la solution de saccharose à l'intérieur du réacteur est établi de façon à ce que le taux de conversion (d'hydrolyse) à la sortie du réacteur soit de l'ordre de 90 %. De tels réacteurs enzymatiques à membrane ont été étudiés par WANG et coll. (1970) et O'NEILL et coll. (1971).

L'invertase extracellulaire de levure (EC 3.2.1.26) est une glycoprotéine contenant environ 50 % d'hydrates de carbone (GASCON et coll., 1968a, 1968b ; NEUMAN et LAMPEN, 1967) ; son poids moléculaire est proche de 270.000 (GASCON et coll., 1968b). L'invertase catalyse l'hydrolyse de sucres possédant un résidu terminal non substitué β -D-fructofuranosyl. La cinétique de l'hydrolyse du saccharose, ainsi que l'effet inhibiteur du substrat et des produits de réaction ont été étudiés (NELSON, 1933 ; MAC LAREN, 1963 ; RUCHTI et MAC LAREN, 1964). Une activité transférasique de l'invertase a été mise en évidence (EDELMAN, 1954 ; ANDERSEN, 1967 ; BASEER et SHALL, 1971). Un mécanisme d'action de l'enzyme a été récemment proposé (WAHEED et SHALL, 1971).

On peut mentionner que les solutions de sucre inverti préparées dans l'industrie sont obtenues par hydrolyse en présence soit d'acide chlorhydrique, soit de résines échangeuses de cations (SCHNEIDER, 1971).

A) INFLUENCE DES CONDITIONS DE REACTION SUR LA CINETIQUE D'HYDROLYSE ET SUR LA STABILITE DE L'ENZYME :

Des expériences d'hydrolyse discontinue du saccharose ont été faites pour caractériser la préparation d'invertase utilisée.

pH

Une zone de pH optimum comprise entre 4,2 et 4,8 est observée et un pH de 4,5 retenu pour la suite de cette étude.

Température

L'influence de la température sur l'activité enzymatique initiale a été étudiée à des concentrations de saccharose de 10 et 60 % (Figure 5).

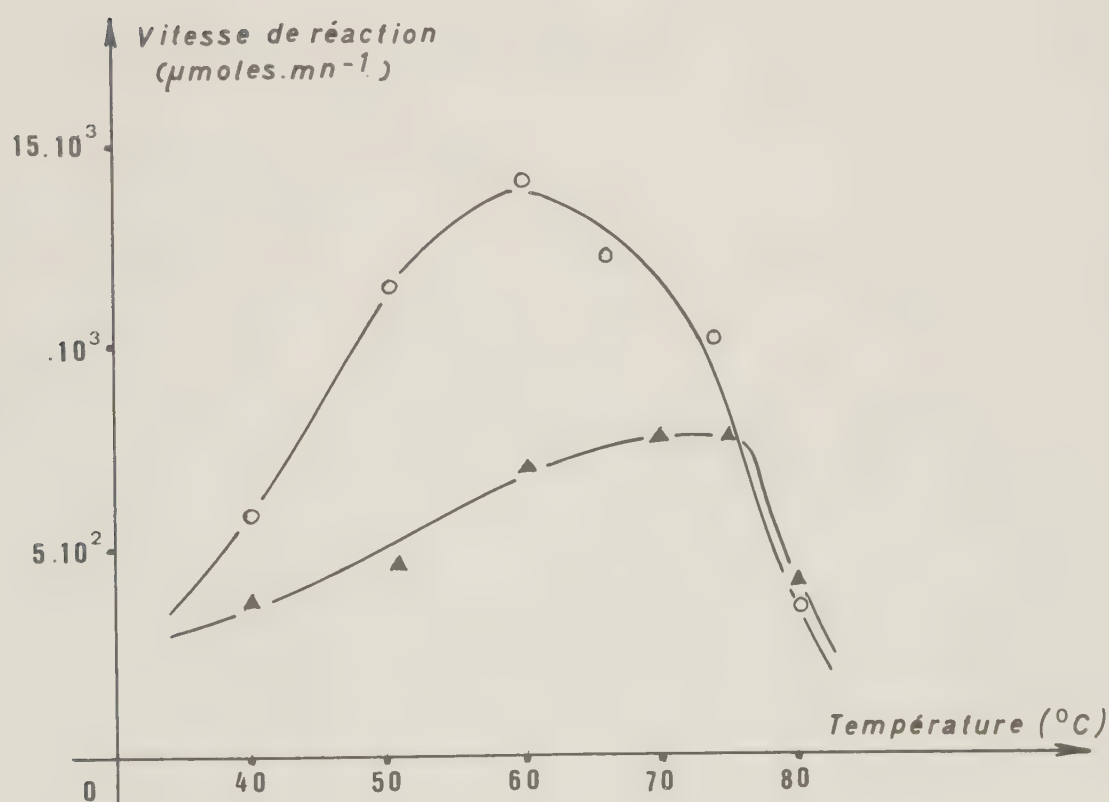


Figure 5

Influence de la température sur l'activité enzymatique initiale de l'invertase de levure. Les vitesses d'hydrolyse sont déterminées et exprimées comme indiqué dans "Matériels et Méthodes".

Concentrations en saccharose : 10 % (O — O) et 60 % (▲ — ▲).

Acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5 ; concentration en invertase : 0,04 mg/ml.

On observe une inhibition de l'activité enzymatique à la plus forte concentration en saccharose utilisée, ainsi qu'un effet protecteur de cette concentration de saccharose vis-à-vis de l'inactivation thermique de l'enzyme (REED, 1966) ; la température optimale d'activité apparaît alors plus élevée. On sait que les courbes d'activité en fonction de la température résultent de deux phénomènes : l'activation thermique de la réaction d'hydrolyse et celle de la dénaturation thermique de l'enzyme. Ainsi la température optimale peut dépendre du temps de réaction, qui est ici de 5 minutes.

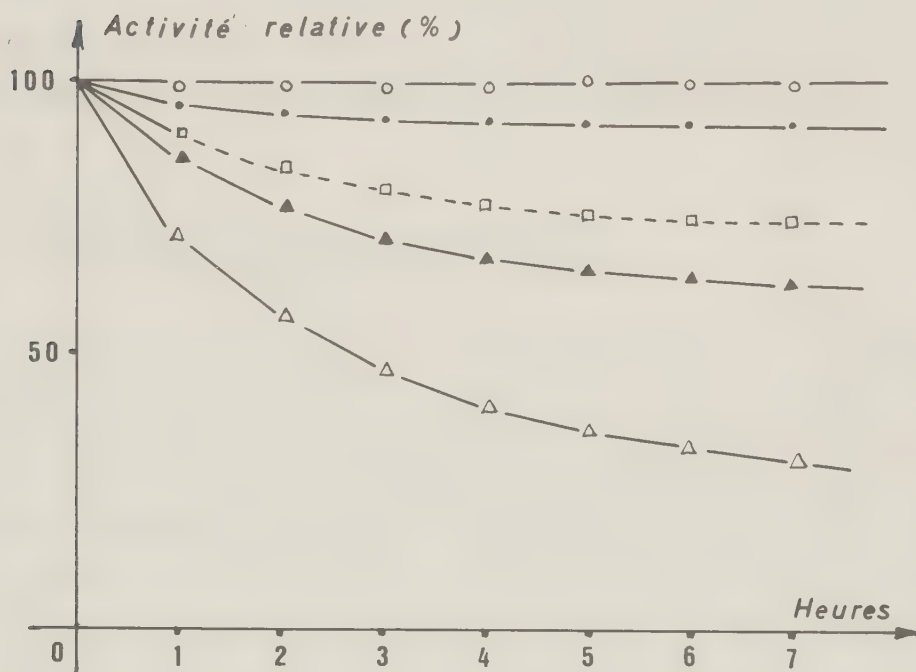


Figure 6

Inactivation de l'invertase de levure par la chaleur. Les solutions d'enzyme (1 mg/ml) sont incubées à diverses températures pendant des durées déterminées. Les activités enzymatiques résiduelles sont alors déterminées comme indiqué dans "Matériels et Méthodes" et exprimées par rapport à l'activité présente au temps zéro de l'incubation. Incubation dans le tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5, à 50°C (○ — ○), 53,5°C (● — ●), 56°C (▲ — ▲), 60°C (△ — △) et dans le même tampon contenant du glucose (5 %) et du fructose (5 %), à 60°C (□ — □).

La température optimale d'opération d'un réacteur à membrane retenant l'enzyme est la température la plus élevée possible ne provoquant aucune perte d'activité enzymatique. La stabilité de l'invertase a donc été étudiée dans le tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5 ainsi que dans une solution de glucose (5 %) et fructose (5 %) dans ce même tampon.

La figure 6 montre qu'il n'y a pas de perte d'activité enzymatique après 7 heures à 50°C, et que la présence de glucose et de fructose ralentit la dégradation de l'invertase à 60°C. En raison de difficultés analytiques, il n'a pas été possible d'étudier la stabilité de l'invertase en présence de concentrations plus élevées de glucose et de fructose, telles qu'elles seraient trouvées dans un réacteur avec alimentation continue en saccharose.

Concentration initiale en saccharose

La vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose a été déterminée en fonction de la concentration initiale en saccharose, en opérant dans un volume de 30 ml, avec une concentration d'invertase de 0,08 mg/ml et à une température de 20 ou 60°C. On observe un maximum de vitesse entre 10 et 15 % de saccharose qui correspondrait à la saturation de l'enzyme (NELSON, 1933). Au-delà de 15 % de saccharose, la vitesse initiale d'hydrolyse décroît (NELSON, 1933) ; pour une concentration en saccharose de 60 %, elle n'est plus que la moitié de l'activité maximum. Ces phénomènes sont connus et ont été commentés par MAC LAREN (1963) et BOWSKI et coll. (1971). La baisse d'activité enzymatique aux concentrations initiales élevées de saccharose serait due aux effets combinés d'une inhibition compétitive par le substrat et d'une faible activité physico-chimique de l'eau. La viscosité élevée du milieu provoque peut-être également un ralentissement des phénomènes de diffusion (RUCHTI et MAC LAREN, 1964).

Activité transférasique de l'invertase

L'hydrolyse du saccharose par l'invertase s'est révélée complète dans les conditions expérimentales adoptées : avec une solution de 50 % de saccharose (50°C, 1,5 mg d'invertase/ml) le glucose libéré après une heure correspond à la quantité théorique introduite sous forme de saccharose. Afin de déterminer

si l'invertase exerce une activité transférasique au cours de l'hydrolyse, nous avons recherché la présence de polysaccharides de fructose et glucose par chromatographie en couche mince selon COLLINS et CHANDORKAR (1971). Des traces de composés autres que saccharose, fructose et glucose ont été observées.

Inhibition par les produits d'hydrolyse

Nous avons vérifié que l'activité hydrolytique de l'invertase est partiellement inhibée par le fructose et, à un moindre degré, par le glucose. La vitesse initiale d'hydrolyse d'une solution de saccharose 0,1 M est abaissée de 80 % en présence de fructose 0,1 M et de 35 % en présence de glucose 0,1 M (22°C, pH 4,5 ; 2 mg d'invertase/ml). On sait que l'inhibition de l'invertase par le fructose est compétitive, tandis que l'inhibition par le glucose ne l'est pas (NELSON, 1933).

Cinétique de réaction

Pour des concentrations initiales en saccharose comprises entre 10 et 60 %, la réaction d'hydrolyse du saccharose suit approximativement une cinétique de premier ordre par rapport à la concentration en substrat, pendant la quasi-totalité de l'hydrolyse (Figure 7). Ce comportement particulier est la résultante de plusieurs effets, y compris de l'inhibition par le substrat et les produits de réaction (NELSON, 1933). Il est difficile de lui donner une explication biochimique précise ; il a cependant facilité la prévision des performances d'un réacteur continu. (Voir plus loin).

Concentration en enzyme

La constante de vitesse de réaction de premier ordre a été mesurée pour des concentrations d'invertase comprises entre 0,1 et 2 mg/ml. Elle répond à la relation suivante : $K = 2 \cdot 10^{-1} (E)$, où K représente la constante de vitesse de réaction de premier ordre (mn^{-1}) et (E) la concentration en invertase (mg/ml).

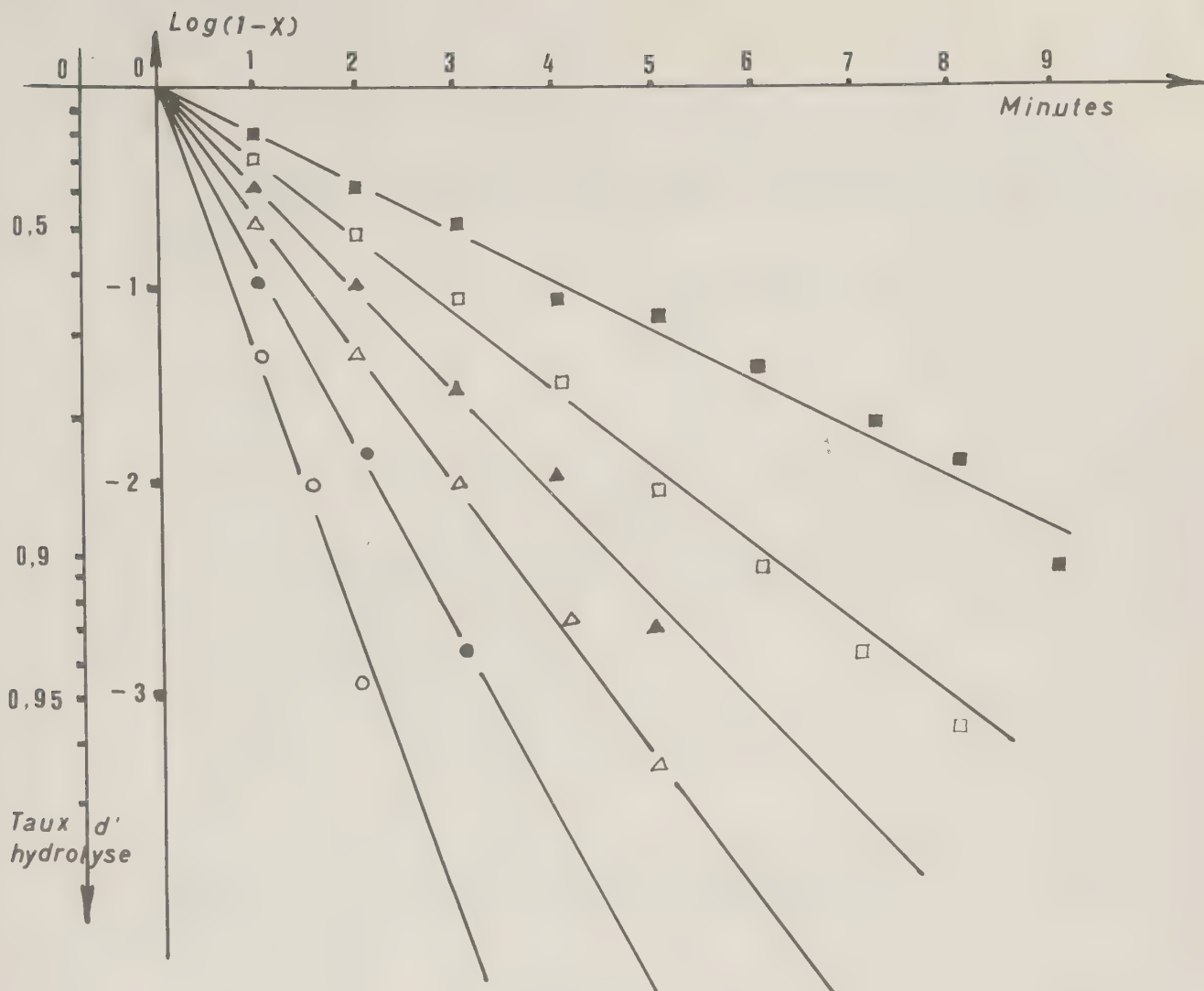


Figure 7

Cinétique de la réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase de levure. Représentation de $\text{Log. } (1 - X)$ en fonction du temps. Les valeurs correspondant au taux d'hydrolyse X figurent sur le deuxième axe d'ordonnée. 50°C ; tampon acétate de sodium $0,01 \text{ M}$, $\text{pH } 4,5$;

Concentration en invertase : 2 mg/ml ; concentration en saccharose : 10% ($\circ - \circ$), 20% ($\bullet - \bullet$), 30% ($\Delta - \Delta$), 40% ($\blacktriangle - \blacktriangle$), 50% ($\square - \square$), 60% ($\blacksquare - \blacksquare$).

Le taux d'hydrolyse est la fraction du saccharose initial qui a été hydrolysé.

B) ULTRAFILTRATION DE SOLUTIONS D'INVERTASE ET DE SOLUTIONS DE SACCHAROSE

HYDROLYSE :

Invertase :

La rétention de l'invertase par divers types de membranes d'ultrafiltration a été étudiée. 50 ml d'une solution d'invertase (2 mg/ml) dans le tampon acétate de sodium sont placés dans la cellule d'ultrafiltration et diafiltrés en continu avec du tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5, pendant 8 heures, à 50°C, sous une pression de 3 bars.

La rétention est exprimée selon l'équation :

$$\text{Rétention} = 100 \left(1 - \frac{A_f}{A_o} \right)$$

où A_f représente l'activité enzymatique retrouvée dans le filtrat et A_o l'activité enzymatique initiale de la solution d'enzyme.

Les données de la figure 8 montrent que la membrane de type PM 30 ne laisse pas passer d'enzyme. Les membranes XM-100 A et XM-300 ne laissent passer l'invertase que dans les premiers 30 ml de filtrat, et le total de l'activité enzymatique traversant la membrane n'excède pas 3 %. Ces résultats excluent la filtration préférentielle totale d'une classe de molécules d'invertase de poids moléculaire inférieur ; ils s'expliquent vraisemblablement par la formation d'une couche dite de "polarisation/de concentration", qui modifie la sélectivité de la membrane.

Le seuil d'arrêt théorique des membranes, le débit mesuré pour chaque membrane, et le bilan des activités enzymatiques sont portés sur le tableau I.

La membrane XM-300, qui permet le débit le plus élevé, a été adoptée pour la suite de cette étude.

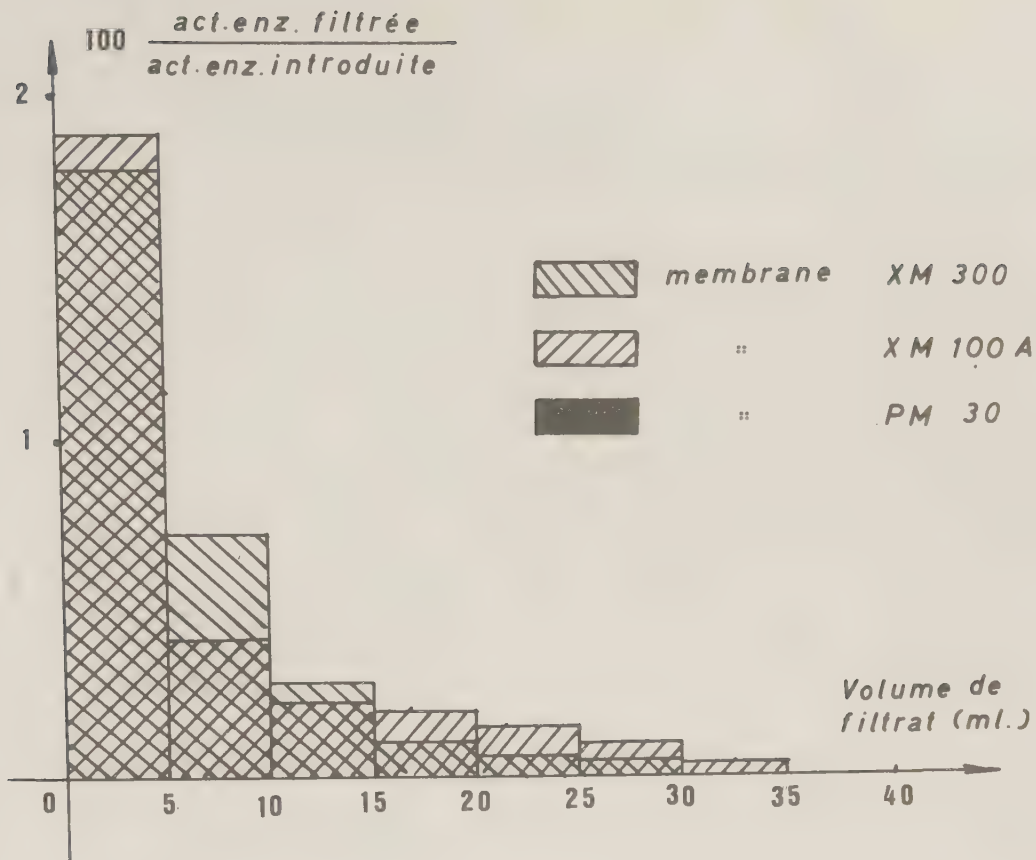


Figure 8

Ultrafiltration de l'invertase de levure. Diafiltration avec du tampon acétate 0,01 M, pH 4,5 ; 50°C. Membranes Amicon Diaflo.

TABLEAU I

Rétention de l'invertase par divers types de membranes d'ultrafiltration. 50°C, 3 bars ; tampon acétate de sodium 0,01 M, PH 4,5 ; concentration en invertase : 2 mg/ml.

Type de membrane	Débit (ml.mn ⁻¹ .cm ⁻²)	Seuil d'arrêt théorique (Dalton)	% d'invertase retenu	% d'invertase dans le filtrat	% d'enzyme non retrouvé
PM 30	0,108	30.000	97	0	3
XM 100 A	0,151	100.000	95,1	2,6	2,3
XM 300	0,175	300.000	93,7	2,8	3,5

Solution de saccharose hydrolysé

La viscosité d'une solution de 50 % de saccharose baisse d'environ 10 % après hydrolyse.

Nous avons préparé des solutions de glucose, fructose et saccharose correspondant à des solutions de concentrations diverses de saccharose hydrolysé à 90 % (analogue à l'effluent d'un réacteur continu).

Les débits d'ultrafiltration de ces solutions (en $\text{ml} \cdot \text{mn}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) à travers la membrane XM-300 ont été mesurés après la période de baisse initiale rapide de débit correspondant probablement à un tassement de la membrane. Une augmentation du débit a été observée en fonction de la pression ainsi qu'en fonction de la température, les intervalles de mesure étant respectivement de 1 à 3 bars et de 40°C à 70°C. L'effet de la température est relié à une modification de la viscosité des solutions.

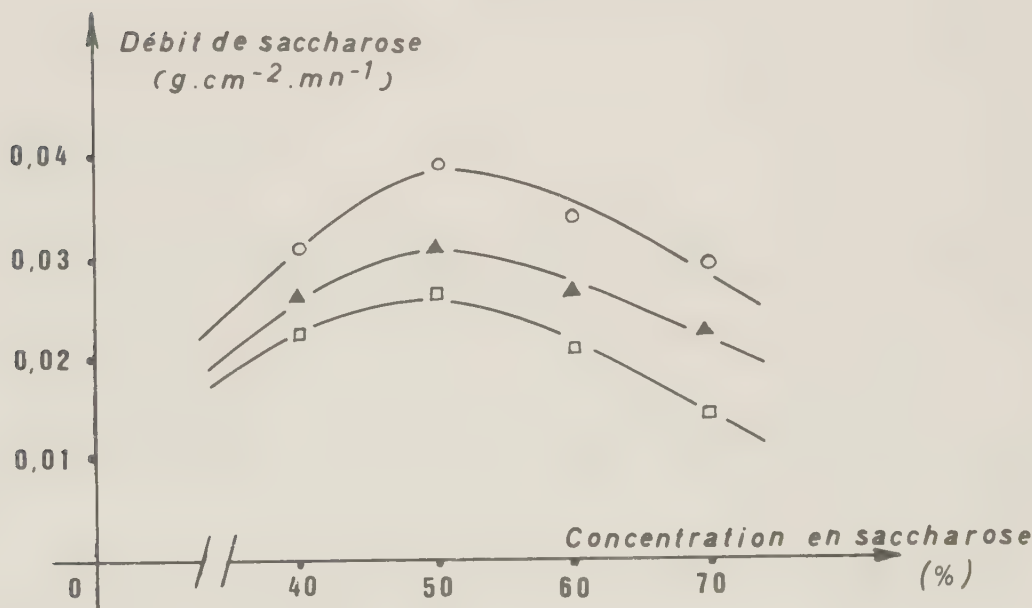


Figure 9

Influence de la concentration de sucre inverti sur le débit matière à travers la membrane d'ultrafiltration. Membrane Amicon Diaflo XM-300 ; 3 bars ; solutions de glucose, fructose et saccharose correspondant à du saccharose hydrolysé à 90 %, dans le tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5. Les débits et les concentrations sont exprimés en gramme de saccharose équivalent.

70°C (O — O) ; 60°C (▲ — ▲) ; 50°C (□ — □).

Les débits d'ultrafiltration exprimés en grammes de saccharose équivalent sont portés sur la figure 9, pour diverses concentrations de saccharose équivalent, à diverses températures, et à une pression constante de 3 bars. Un débit maximum de sucres est observé pour une concentration de saccharose équivalent de 50 %. C'est la concentration que nous avons utilisée pour les expériences continues.

Les débits volume correspondant à tous les points de la figure 9 répondent à la relation empirique suivante :

$$\phi = 0,08 + 0,05 \log. \frac{1}{\eta}$$

où ϕ est le débit en $\text{ml} \cdot \text{mn}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$

η la viscosité des solutions en centipoise.

C) HYDROLYSES CONTINUES :

Calcul des performances d'un réacteur continu homogène et vérification expérimentale

Nous avons d'abord vérifié avec une solution d'hélianthine que le réacteur Radiometer se comportait bien comme un réacteur homogène (LEVENSPITEL, 1967).

Le système utilisé pour l'hydrolyse continue sans réutilisation d'enzyme est celui présenté sur la figure 1. Le réacteur agité est alimenté en continu avec des solutions de saccharose et d'invertase. La concentration de saccharose équivalent dans le réacteur est toujours de 50 %. La concentration d'invertase et le temps de résidence nominal θ (égal au rapport

$\frac{\text{volume du mélange réactionnel}}{\text{débit à travers le réacteur}}$) sont variables d'une expérience à l'autre. Le volume du mélange réactionnel est maintenu constant à l'aide d'un trop plein

La variation instantanée de concentration (S) du saccharose par unité

de temps à l'intérieur du réacteur est égale à la somme algébrique des variations de concentrations dues à l'entrée de saccharose, à la sortie de saccharose et à la réaction d'hydrolyse.

$$\left(\frac{d(S)}{dt} \right)_{\text{réacteur}} = \left(\frac{d(S)}{dt} \right)_{\text{entrée}} + \left(\frac{d(S)}{dt} \right)_{\text{sortie}} + \left(\frac{d(S)}{dt} \right)_{\text{hydrolyse}}$$

$$\left(\frac{d(S)}{dt} \right)_{\text{réacteur}} : \text{est nul lorsque l'état d'équilibre est atteint.}$$

$$\left(\frac{d(S)}{dt} \right)_{\text{entrée}} = \frac{v}{V} \cdot (S_0)$$

$$\left(\frac{d(S)}{dt} \right)_{\text{sortie}} = - \frac{v}{V} \cdot (S)$$

où v est le débit à travers le réacteur, et V le volume de mélange réactionnel.

$\left(\frac{d(S)}{dt} \right)_{\text{hydrolyse}}$ est ici égal à $-K(S)$ où K est la constante de vitesse de réaction de premier ordre par rapport à la concentration en substrat.

La relation précédente s'écrit alors :

$$\frac{v}{V} \cdot (S_0) - \frac{v}{V} \cdot (S) - K(S) = 0$$

Le calcul aboutit à la relation suivante (MAC MULLIN ET WEBER, 1935) :

$$\frac{X}{1-X} = K \Theta$$

où X est le taux de conversion ($0 \leq X \leq 1$), c'est-à-dire la fraction du saccharose initial qui a été hydrolysé.

La relation précédente permet de calculer le taux d'hydrolyse théorique d'une opération continue à partir de Θ , et de K précédemment déterminée lors d'expériences discontinues. Ces taux d'hydrolyse théoriques peuvent être comparés aux taux d'hydrolyse expérimentaux d'essais continus (Tableau II et Figure 10). L'accord observé entre ces valeurs montre que la relation

$\frac{X}{1-X} = K \Theta$ permet de prévoir l'influence du temps de résidence nominal et de la concentration en enzyme sur le taux d'hydrolyse continu. Ce type de calcul de réacteur est fréquemment utilisé en génie chimique (LEVENSPIEL, 1967 ; KLAUDKO, 1971).

TABLEAU II

Performances du réacteur continu homogène en fonction de la concentration en invertase, et du temps de résidence nominal. Le montage utilisé est celui de la figure 2. 50°C ; tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5 ; concentration en saccharose équivalent dans le réacteur : 50 %. K , constante de vitesse de réaction de premier ordre ; θ , temps de résidence nominal ; X , taux d'hydrolyse.

Concentration en invertase (mg/ml)	0,1	0,2	0,5	0,8	0,94
K correspondant (a) (mn ⁻¹)	$2 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-2}$	10^{-1}	$1,6 \cdot 10^{-1}$	$1,88 \cdot 10^{-1}$
$\theta = \frac{\text{volume}}{\text{débit}}$ (mn)	60	30	30	30	60
K, θ	1,2	1,2	3	4,8	11,3
X théorique (%)	54,3	54,3	75	82,7	91
X expérimental (%)	54	50,3	75	84	92

(a) Les valeurs de K proviennent de la relation $K = 2 \cdot 10^{-1}(E)$ où (E) est la concentration en invertase (mg/ml).

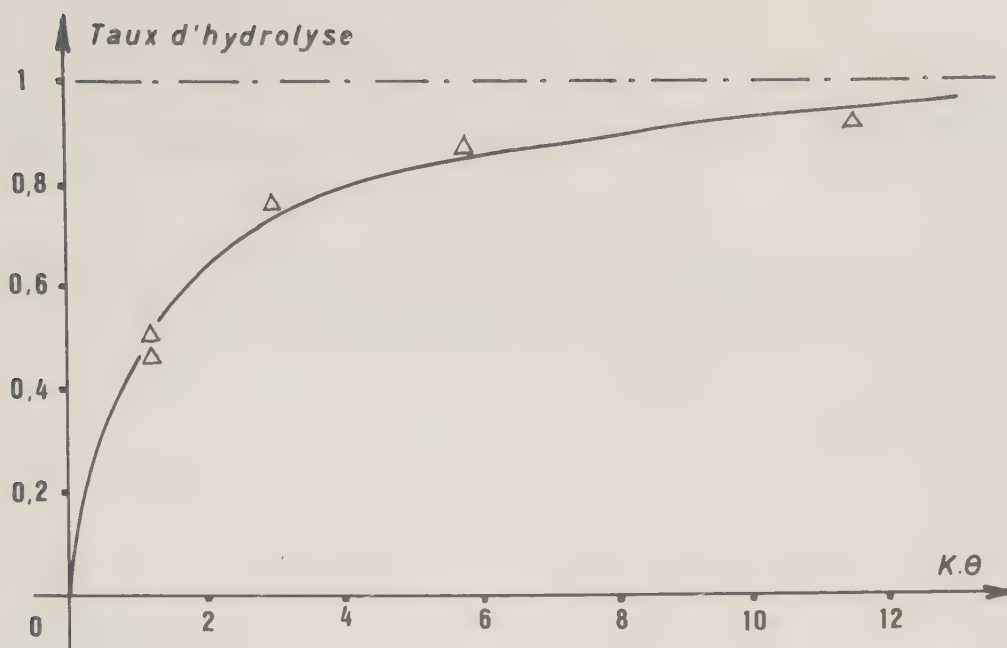


Figure 10

Représentation du taux d'hydrolyse continue du saccharose en fonction du produit $K.\theta$. Le montage utilisé est celui de la figure 1. K , constante de vitesse de réaction de premier ordre (mn^{-1}) ; θ , temps de résidence nominal (mn). 50°C ; tampon acétate de sodium $0,01\text{ M}$, pH 4,5 ; concentration en saccharose équivalent dans le réacteur : 50 %. Courbe théorique répondant à la relation $\frac{x}{1-x} = K.\theta$ (—).

Points expérimentaux (Δ).

On peut faire remarquer que si la réaction avait suivie une cinétique différente, il aurait été sans doute plus difficile, mais néanmoins possible, d'obtenir une équation empirique reliant la vitesse de réaction à la concentration de substrat, et d'introduire cette équation dans le bilan de matière du réacteur chimique.

Hydrolyse continue avec rétention d'enzyme par la membrane d'ultrafiltration

Le système utilisé est celui représenté sur la figure 3. L'invertase est retenue par la membrane d'ultrafiltration et donc réutilisée. Le saccharose est introduit de façon continue. Le taux d'hydrolyse du mélange

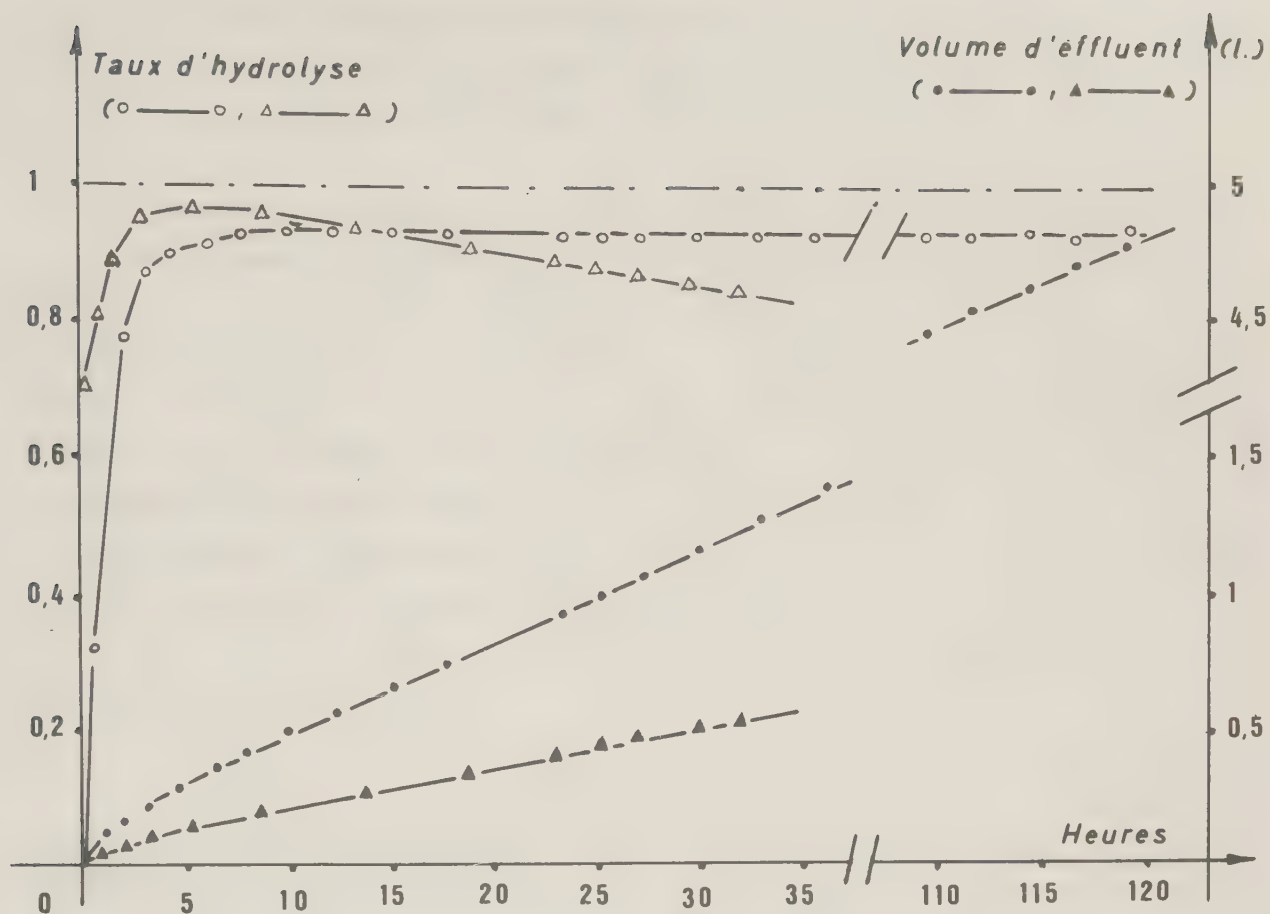


Figure 11

Variation du taux d'hydrolyse lors d'hydrolyses continues du saccharose avec réutilisation de l'invertase par ultrafiltration. Le montage utilisé est celui de la figure 3. Tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5 ; concentration en saccharose : 50 % ; membrane Amicon Diaflo XM 300.

Expérience à 50°C (●—●, ○—○) ; volume réactionnel : 50 ml ; concentration en invertase : 0,4 mg/ml ; temps de résidence nominal : 90 mn ; taux d'hydrolyse initial du saccharose dans le réacteur : 0.

Expérience à 53,5°C (▲—▲, △—△) ; volume réactionnel : 60 ml ; concentration en invertase : 0,36 mg/ml ; temps de résidence nominal : 180 mn ; taux d'hydrolyse initial du saccharose dans le réacteur : 67 %.

sortant est égal à celui du mélange réactionnel dans le réacteur. La cellule d'ultrafiltration se comporte comme un réacteur homogène dans les conditions expérimentales utilisées (LEVENSPIEL, 1967).

Nous avons constaté, au cours d'opérations prolongées, que le débit à travers la membrane baissait d'environ 15 % par jour. Cette baisse peut être évitée si la solution de saccharose utilisée est préalablement filtrée à travers une membrane d'ultrafiltration analogue. Dans ces conditions, le débit et le temps de résidence sont restés constants au cours d'une hydrolyse continue de 120 heures. Pour cette expérience, la température était 50°C, la concentration en saccharose du liquide d'alimentation 50 %, la quantité d'invertase dans la cellule d'ultrafiltration 20 mg et le temps de résidence nominal 90 minutes. Le volume du mélange réactionnel dans la cellule est resté égal à 50 ml pendant toute l'hydrolyse. Aucun développement de micro-organisme n'a été observé.

La figure 11 indique le volume de solution recueilli en fonction du temps, et le taux d'hydrolyse de cette solution. On voit que ce taux d'hydrolyse, une fois l'équilibre atteint, est resté constant et égal à 87 %, pendant 120 heures. Ceci montre que l'invertase n'est que très peu ou pas dégradée au cours de cette opération avec rétention d'enzyme à 50°C. Le taux d'hydrolyse mesuré de 87 % peut être comparé au taux d'hydrolyse théorique de 88 %. Une expérience effectuée à 53,5°C révèle une baisse assez rapide du taux d'hydrolyse (Figure 11).

Du fait de la réutilisation sans perte de l'invertase à 50°C, il semble que l'efficacité du réacteur à membrane d'ultrafiltration peut être augmentée en opérant à une concentration plus élevée en enzyme. Des essais ont cependant montré que le débit de sucre inverti à travers la membrane d'ultrafiltration baisse rapidement lorsque la concentration d'invertase dépasse 1,5 mg/ml (baisse de débit de 40 % pour 1,8 mg d'invertase par ml).

Dans les conditions d'opération continue avec rétention d'enzyme (Figure 11, 50°C), 20 mg d'invertase ont permis d'hydrolyser 2,1 kg de saccharose en 120 heures. Dans des conditions d'opération discontinue sans rétention d'enzyme, la même quantité d'invertase, en présence d'une solution de 50 % de saccharose, à 50°C, permet d'hydrolyser 2,1 kg de saccharose en 35 heures. La capacité de réacteur nécessaire est cependant près de 100 fois plus élevée. L'avantage du réacteur continu à membrane d'ultrafiltration est d'autant plus grand que la réutilisation de l'enzyme est prolongée.

CHAPITRE II : HYDROLYSE CONTINUE DU SACCHAROSE PAR DE L'INVERTASE IMMOBILISEE PAR ADSORPTION DANS UN REACTEUR TUBULAIRE.

L'invertase a été immobilisée sur une phase insoluble adaptée au fonctionnement en réacteur tubulaire : des particules enzymatiquement actives ont été réalisées à l'aide de résines échangeuses d'ions type Amberlite sur lesquelles l'invertase a été adsorbée. Nous avons utilisé ces particules pour remplir une colonne et déterminé l'activité enzymatique de cette colonne en régime stationnaire, lorsqu'un flux de substrat la traverse. La cinétique de réaction a été étudiée en fonction des différents paramètres du système (vitesse d'écoulement, concentration en saccharose).

A) ADSORPTION DE L'INVERTASE SUR LES PARTICULES DE RESINES ECHANGEUSES D'IONS :

Travaux antérieurs :

La littérature indique de nombreux essais de fixation de l'invertase sur des supports insolubles (Tableau A). Nous signalons également l'article très récent de Saini et coll. (1972).

Méthode	Support	Référence
Adsorption physique	Charbon actif	NELSON et HITCHOCK (1921)
	Hydroxyde d'aluminium	FISHER et KOHTES (1951 b)
	Cellulose	REESE et MANDELS (1958)
	Verre	ARNOLD (1966)
	Collagène	WIETH et Coll. (1972)
Liaison covalente	Polystyrène	FILIPPUSON et HORNBY (1970)
	Brique	MONSAN et DURAND (1971)
	Verre	MASON et WEETALL (1972)
Inclusion	Acide tannique	NEGORD (1970)

TABEAU A : Fixation de l'invertase sur des supports insolubles

L'adsorption d'enzymes par des résines échangeuses d'ions a déjà fait l'objet d'un certain nombre de travaux (tableau B) et les auteurs de ces travaux ont constaté que les enzymes conservaient leur activité après avoir été adsorbées.

Résines	Enzymes	Références
A : D.E.A.E. cellulose	Catalase	MITZ (1956)
n :	Protéase	MITZ et SCHLUETER (1959)
i :	Invertase	SUZUKI et coll. (1966)
o :	Glucose oxydase	MIYAMOTO et coll. (1972)
n. :	Ribonucléase	BARNETT et BULL (1959)
: DOWEX 2	:	:
C : C.M. Cellulose	Chymotrypsine	MITZ et SCHLUETER (1959)
a : DOWEX 50	Ribonucléase	BARNETT et BULL (1959)
t :	:	:
i :	:	:
o :	:	:
n. :	:	:

TABLEAU B : Adsorption de diverses enzymes sur quelques types de résines échangeuses d'ions.

Méthodes d'adsorption :

Les résines Amberlite que nous avons utilisées sont obtenues à partir de polymères de styrène réticulé à l'aide de divinyl - benzène. Elles sont soit du type "gel", soit du type "macroréticulé". Les résines du type "gel" ne possèdent aucune porosité réelle ; les résines du type "macroréticulé" sont comparables à des billes rigides mais de structure spongieuse. Elles possèdent des pores de diamètre moyen égal à 1300 Å. Les résines macroréticulées présentent un avantage par rapport aux résines conventionnelles du type "gel" ; la présence de pores de taille relativement grande permettrait l'adsorption d'ions de poids moléculaire élevé (voir Notice Amberlite, Rohm and Haas)

Les résines sont préalablement lavées avec de l'eau distillée puis équilibrées avec une solution de tampon acétate de sodium 0,1 M ; on utilise un tampon de pH 5 pour les résines anioniques et de pH 4 pour les résines cationiques. Après filtration, les résines sont séchées sous vide. Elles sont alors imbibées avec une solution d'invertase (2 ml d'une

solution à 1,5 mg d'invertase par ml par gramme de résine) dans le tampon acétate de sodium (toujours de pH 5 pour les résines anioniques et 4 pour les résines cationiques). Le point isoélectrique de l'invertase étant proche de 4,5 (NELSON, 1933) la molécule est chargée négativement à un pH supérieur à 4,5 et positivement à un pH inférieur. L'adsorption est faite pendant 12 heures à 4° afin de provoquer le moins possible de dénaturation. On sait que l'invertase est stable entre pH 4 et 6,5 (FISCHER et coll, 1951).

Après adsorption de l'invertase, les résines sont lavées avec la solution tampon utilisée pour l'adsorption (20 ml par gramme de résine sous agitation pendant 30 minutes à 20°). Ce lavage est renouvelé jusqu'à ce que l'absorbance de la solution à 275 nm devienne nulle à cette longueur d'onde. Nous avons préalablement vérifié que cette absorbance est uniquement due à l'invertase (Matériels et Méthodes, paragraphe "Méthode de dosage de l'invertase").

Rendement d'activité enzymatique adsorbée :

Pour chaque résine utilisée nous avons déterminé le rendement global d'activité enzymatique adsorbée par le pourcentage de l'activité enzymatique immobilisée sur la résine, mesurée à un pH optimum (voir Matériels et Méthodes, et plus loin, paragraphe "Influence du pH sur l'activité enzymatique adsorbée"), par rapport à l'activité enzymatique (à pH 4,5) de la totalité de l'invertase utilisée pour l'adsorption.

Il s'agit donc du rendement global d'activité enzymatique conservée et non du rendement d'adsorption de l'invertase. Rappelons que le rendement global d'activité enzymatique adsorbée est le produit de deux rapports :

$$\left(\frac{\text{Quantité d'invertase adsorbée}}{\text{Quantité d'invertase mise en contact avec la résine}} \right) \times \left(\frac{\text{Activité enzymatique de l'invertase adsorbée}}{\text{Activité enzymatique d'une même quantité d'invertase en solution}} \right)$$

Les résultats obtenus avec les différents supports testés sont regroupés sur le tableau III.

Type de résine	Dénomination de l'Amberlite (et type de l'échange)	Groupe Fonctionnel	Domaine de pH permettant l'échange d'ions	pH d'adsorption	Rendement global d'activité enzymatique (au pH optimum)
"Cationique"	IR 120 (cationique)	$-R_3N^+$	0 - 14	4	21 %
	IRA 68 (cationique)	$-R_3N^+$	0 - 14	4	23 %
	IRA 410 (anionique)	$-N(CH_3)_2$	0 - 14	5	13 %
	IR 45 (anionique)	$-NR_2$	0 - 9	5	20 %
"Anionique"	IRA 200 (cationique)	$-R_3N^+$	0 - 14	4	32 %
	IRA 900 (anionique)	$-N(CH_3)_2$ $-OCH_2-CH_2-O^-$	0 - 14	5	53 %
	IRA 93 (anionique)	$-NR_2$	0 - 9	5	50 %

Tableau III : Adsorption de l'invertase sur des résines échangeuses d'ions.

Rendement d'activité enzymatique observé avec les différentes résines Amberlite utilisées. Tampon acétate de sodium 0,01 M ; durée de l'adsorption 12 heures (4°C) ; quantité de solution d'invertase utilisée : 2 ml d'une solution à 1,5 mg par ml de résine.

On peut remarquer que lors de l'adsorption toutes les résines ont une charge électrique opposée à celle de l'invertase, sauf la résine IRA 200 qui est faiblement acide (pK égal à 6,1). A un pH inférieur à 6,1 celle-ci n'est pas chargée et sa charge est donc nulle. Les résines faiblement basiques (IR 45, IRA 93) sont chargées positivement lors de l'adsorption à pH 5, leurs pK étant supérieurs à 7.

Les résultats indiquent que l'on retrouve à l'état adsorbé sur la résine une proportion importante (10 à 50 %) de l'activité enzymatique de l'invertase libre.

Le rendement d'activité enzymatique adsorbée sur la résine IRC 50 semble montrer que l'adsorption n'est pas due uniquement à l'attraction entre des charges électrostatiques de signe opposé.

Le tableau III montre également que les résines macroréticulées ont un rendement d'activité enzymatique supérieur à celui des résines type "gel". Cette différence est probablement liée à la structure poreuse de ces résines. L'adsorption de l'invertase y est très vraisemblablement quantitativement plus importante.

se $\left(\begin{array}{l} \text{quantité d'invertase adsorbée} \\ \text{quantité d'invertase mise en} \\ \text{contact avec la résine} \end{array} \right)$ Nous avons tenté d'évaluer le rendement d'adsorption de l'invertase en fonction de la concentration d'in-

vertase utilisée lors de l'adsorption. Les résines utilisées pour cet essai étaient les Amberlites IRA 93 et IRA 900 (cationiques, macroréticulées) et 200 (anionique, macroréticulée). Pour cela, l'adsorption a été faite avec des solutions d'invertase de concentrations croissantes, de telle sorte que les rapports mg d'invertase par g de résine utilisés lors de l'adsorption varient entre 3 et 60.

Après adsorption, la résine est lavée à plusieurs reprises dans un grand volume de tampon acétate de sodium 0,01 M pH 5 (comme indiqué précédemment) jusqu'à ce que l'adsorbance à 275 nm de la solution de lavage soit nulle. La figure 12 montre qu'environ 83 % et 87 % de l'invertase est désorbée lorsque les expériences d'adsorption sont faites avec les résines IRA 900 et 200, et environ 42 % lorsque les expériences sont faites avec la résine IRA 93. La capacité d'adsorption de cette dernière résine dans les conditions expérimentales utilisées semble ainsi plus importante.

Après lavage, l'activité enzymatique de la résine est mesurée et la figure 13 montre cette activité en fonction du rapport $\left(\frac{\text{mg d'invertase}}{\text{g de résine}} \right)$. Le maximum d'activité obtenu avec la résine IRA 93 pour une valeur de ce rapport, supérieur ou égal à 40, est plus élevé que ceux obtenus avec les résines IRA 900 et 200, les valeurs du rapport sont alors que de l'ordre de 8 et 5. La figure 14 donne le rendement global d'activité en fonction du même rapport. On observe une baisse au-delà des valeurs égales à 30 pour la résine IRA 93 et à 6 et 5 pour les résines IRA 900 et 200.

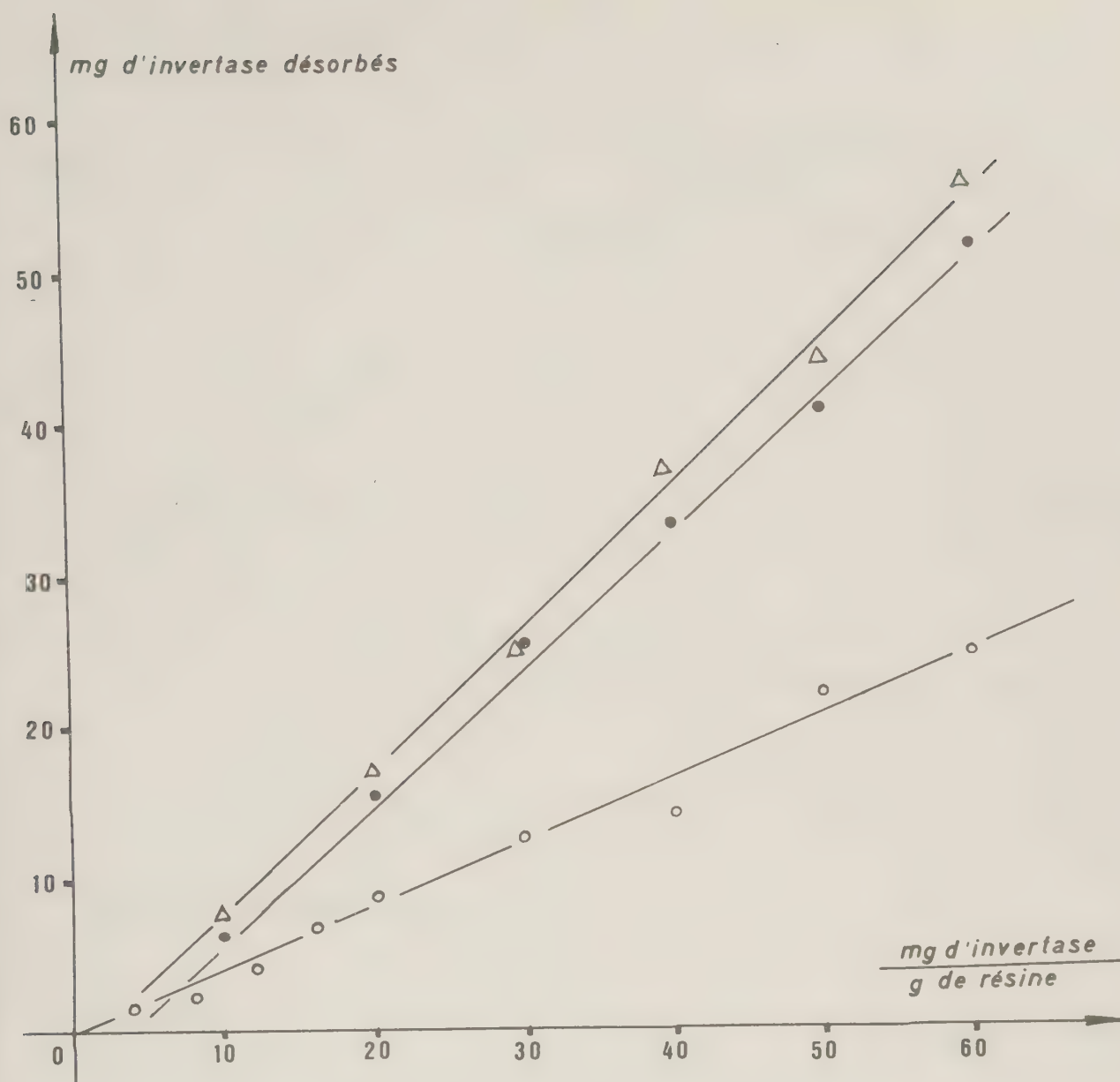


Figure 12

Désorption de l'invertase en fonction du rapport $\frac{\text{mg d'invertase}}{\text{g de résine}}$.

Température : 22°C, tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 5.

Résine IRA 93 (○ — ○), IRA 900 (● — ●), 200 (Δ — Δ)

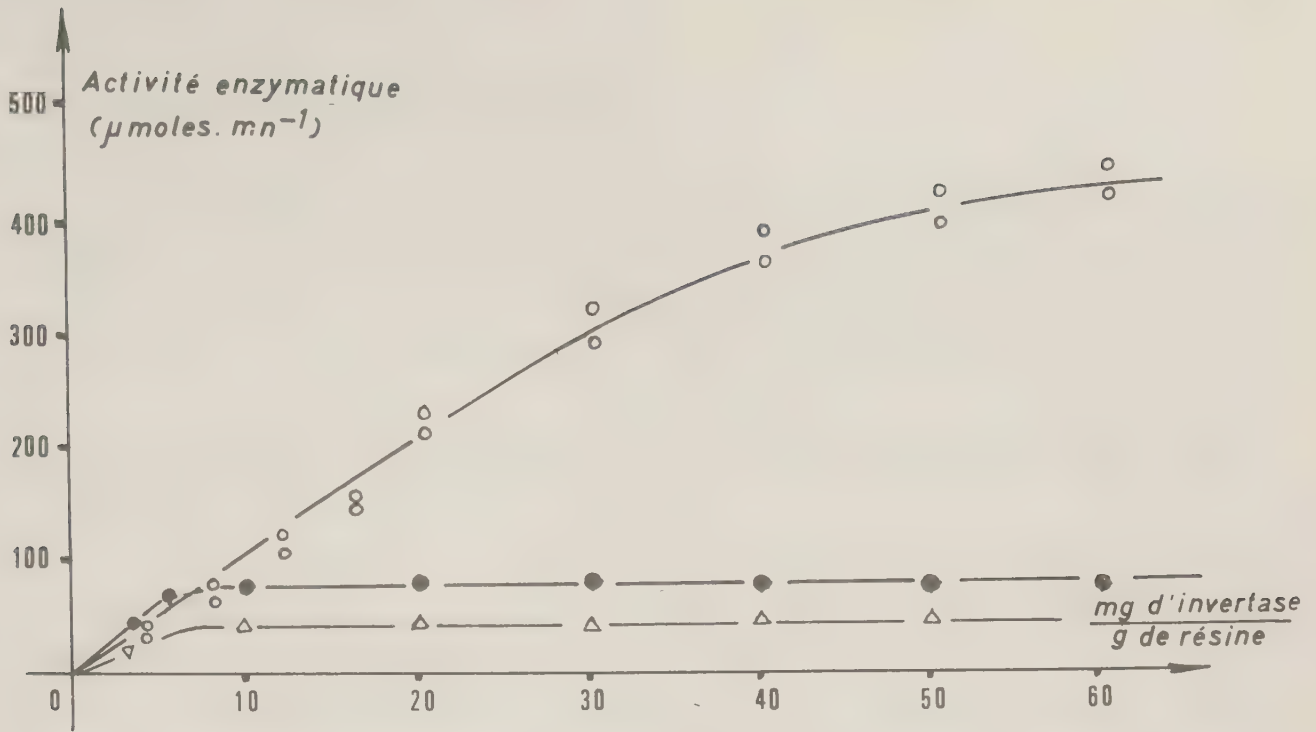


Fig 13. Influence du rapport $\frac{\text{mg d'invertase}}{\text{g de résine}}$ sur l'activité des résines IRA 93 (o—o) et IRA 900 (●—●). Solution de saccharose 10 % ; tampon acétate de sodium 0,001 M, pH 4 ; 30° ; 0,1 % de résine dans un volume réactionnel de 50 ml.
La résine 200 (Δ — Δ) a été étudiée dans le tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 5.

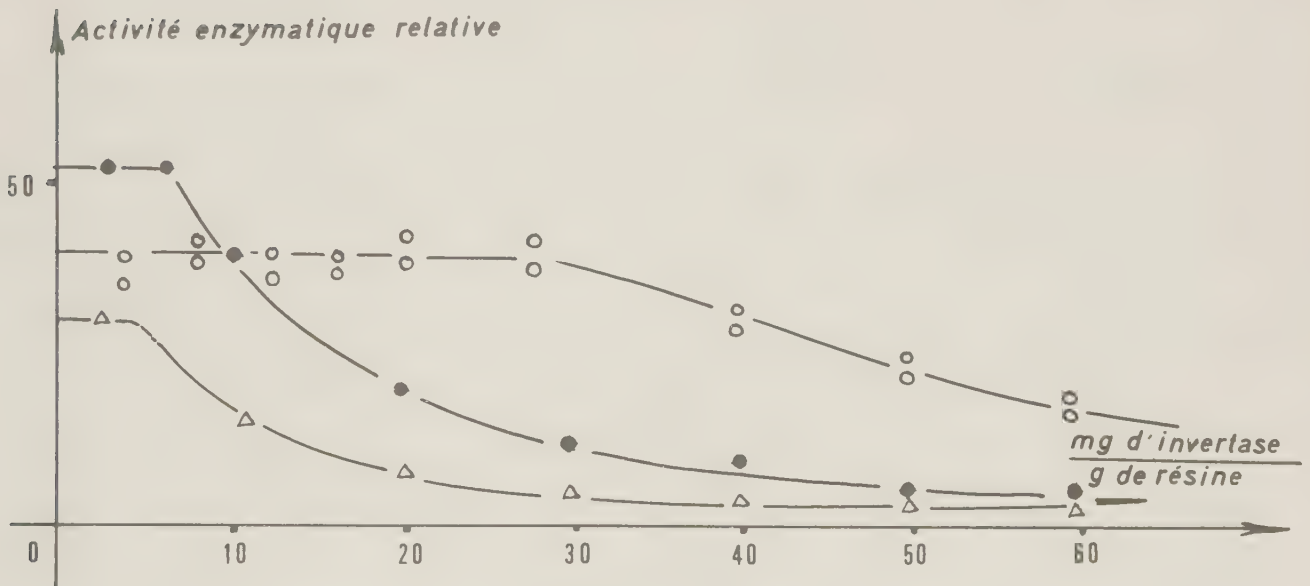


FIG 14. Influence du rapport $\frac{\text{mg d'invertase}}{\text{g de résine}}$ sur le rendement d'activité des résines IRA 93 (o—o) et IRA 900. Solution de saccharose 10 % ; tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4 ; 30° ; 0,1 % de résine dans un volume réactionnel de 50 ml.
La résine 200 (Δ — Δ) a été étudiée dans le tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 5.

B) PROPRIETES DE L'INVERTASE ADSORBEE

Des expériences d'hydrolyse discontinue du saccharose ont été faites pour étudier les propriétés des différents complexes invertase - résine. Toutes les résines utilisées dans ce paragraphe ont été préparées par adsorption de l'invertase, et le rapport $\left(\frac{\text{mg d'invertase}}{\text{g de résine}} \right)$ est égal à 3.

Stabilité de l'adsorption de l'invertase sur des résines Amberlite en fonction de la force ionique et du pH.

Nous avons d'abord vérifié que l'activité enzymatique adsorbée sur les résines IRA 93, IRA 900 et 200 restait constante après un lavage supplémentaire par un tampon acétate de sodium 0,01 M pH 4.

Nous avons alors mesuré la désorption de l'invertase adsorbée sur les résines macroréticulées en fonction de la molarité et du pH des solutions de lavage (le volume et température des solutions de lavage sont indiqués précédemment).

Le tableau IV indique l'activité enzymatique résiduelle après lavage des résines par des solutions de tampon acétate de sodium de forces ioniques différentes et de pH différents. Le tampon de lavage est renouvelé jusqu'à ce que la désorption semble nulle (adsorbance à 275 nm).

Type de résine Amberlite	IRA 93				IRA 900				200			
Molarité du tampon acétate de sodium	0,1		1		0,1		1		0,1		1	
pH	3	5,9	2,4	6,3	3	2,4 5,9	2,4	6,3	3	5,8	2,4	6,3
Activité conservée sur la résine (%)	85	85	55	43	90	84	73	63	92	93	75	64

TABLEAU IV : Désorption de l'invertase en fonction de la molarité et du pH (22° C). Le % d'activité conservée est calculé par rapport à l'activité mesurée avant désorption

Ces résultats montrent que la désorption d'une protéine adsorbée sur un support ionique n'est pas négligeable. De telles observations ont été faites par LILLY (1972). Il semble cependant que la désorption soit plus sensible à une variation de concentration saline, qu'à une variation de pH.

Influence du pH sur l'activité de l'invertase adsorbée

Les résultats indiqués sur la figure 15, montrent un déplacement du pH optimum de l'enzyme adsorbée par rapport au pH optimum de l'enzyme libre.

De tels résultats ont déjà été observés par GOLDMANN et coll. (1965) : ce déplacement serait dû à une différence de pH entre la solution et l'environnement immédiat des résines.

La figure 15 montre également que le pH optimum de l'invertase adsorbée sur des résines cationiques est déplacé vers les pH plus basiques (1 à 0,5 unité pH). Inversement pour des résines anioniques, le déplacement du pH optimum se fait vers des pH plus acides (1,5 à 0,5 unités pH).

Ce phénomène est connu. GOLDSTEIN et coll. (1964) ont montré qu'il est dû à une distribution inégale des ions hydrogènes et hydroxyles entre la "phase ionique" où l'enzyme est immobilisée et la solution extérieure. Ce phénomène est également responsable de la modification de l'allure de la courbe de pH dépendance que nous observons.

Ainsi, si le pH d'un support ionique ne peut être mesuré directement, il peut être déduit de la comparaison de la pH dépendance de l'enzyme libre avec le pH dépendance de la même enzyme fixée sur le support ionique.

Nous avons également mesuré l'influence de la molarité du tampon sur le déplacement du pH optimum de l'invertase adsorbée sur la résine IRA 93. La figure 16 indique qu'il n'y a pas d'atténuation de ce déplacement avec l'augmentation de la molarité du tampon. Une telle atténuation a été trouvée par GOLDSTEIN et coll. (1965) avec un copolymère éthylène-acide maléique-trypsine. Dans ce cas, le substrat synthétique utilisé était vraisemblablement chargé et l'on peut concevoir que la distribution de ce substrat entre la phase insoluble et la solution, soit fonction de la force ionique. GOLDSTEIN et coll. ont fait intervenir la loi de distribution des ions de Maxwell-Boltzmann afin d'expliquer ce phénomène. Dans nos expériences, le saccharose et les produits de réactions n'ont aucune charge électrique. La figure 16 indique également l'existence d'une molarité optimum (0,1 M) du tampon acétate vis-à-vis de l'activité enzymatique. Nous n'avons pu expliquer ce phéno-

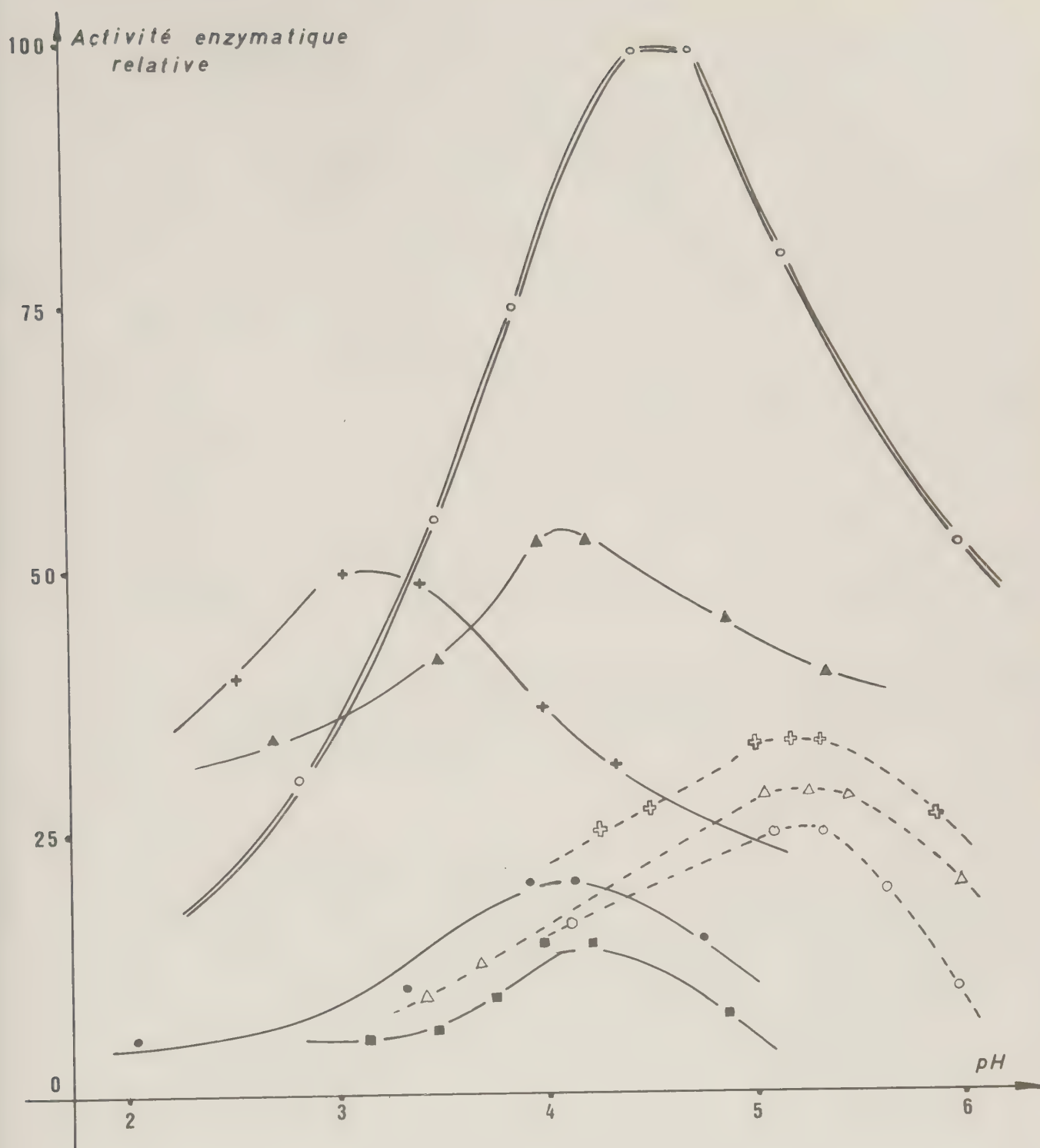


Figure 15

Activité relative en fonction du pH de la solution.

Invertase en solution (O=O)

Invertase immobilisée sur les résines suivantes :

a) Résines anioniques IRA 93 (+—+)

IRA 900 (▲—▲)

IRA 45 (●—●)

IRA 410 (■—■)

b) Résines cationiques IRC 200 (⦿--⦿)

IRC 50 (□--□)

IRC 120 (Δ--Δ)

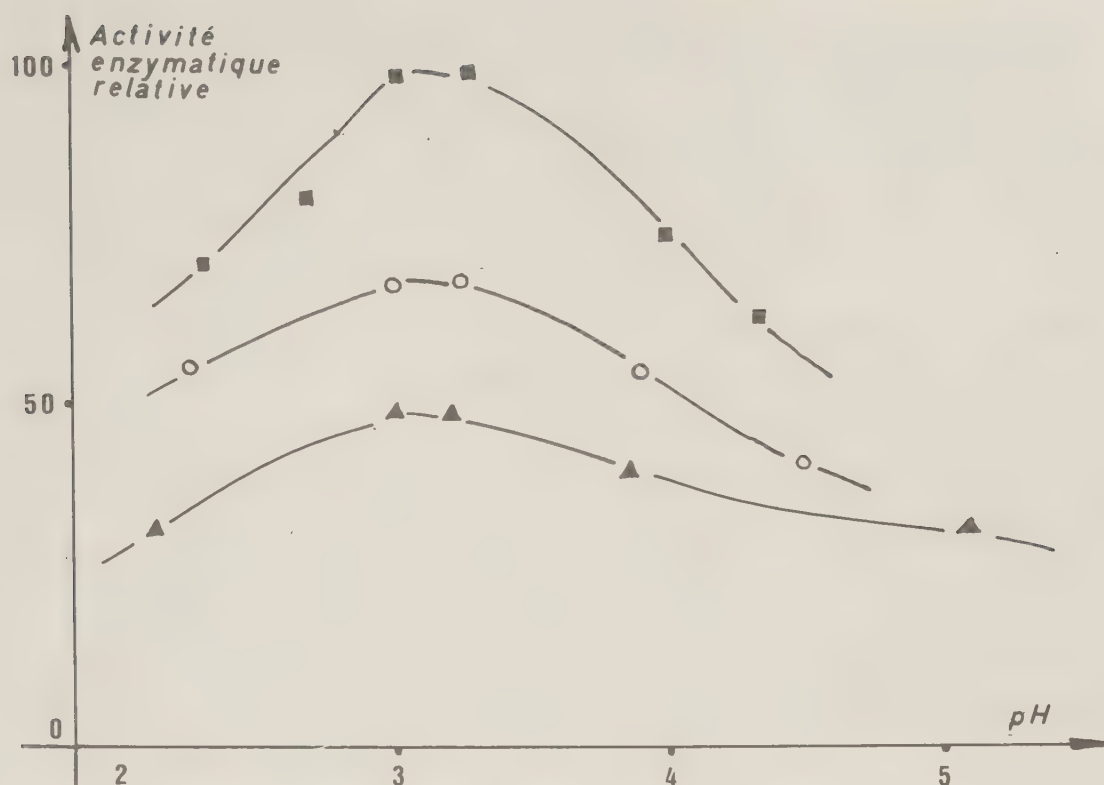


Figure 16

Influence de la molarité du tampon sur la pH dépendance de l'invertase absorbée sur la résine IRA 93. Tampon acétate de concentration M (▲—▲), 0,1 M (■—■), 0,01 M (○—○).

mène, mais on peut remarquer que dans les conditions expérimentales adoptées (temps de réaction, 6 minutes) la désorption est négligeable: en effet, dans le cas contraire une variation du pH optimum serait observée. Nous avons d'autre part vérifié que l'activité enzymatique de l'invertase en solution, à pH 4,5, par rapport à l'activité présente dans du tampon acétate de sodium 0,01 M, baissait de 15 % et 22 % lorsque la molarité de ce tampon était respectivement 0,1 M et 1 M.

Effet de la température sur l'activité de l'invertase adsorbée

L'influence de la température sur l'activité enzymatique de la résine a été étudiée avec des solutions de tampon acétate 0,01 M pH 4, contenant 10 % et 60 % de saccharose. Nous avons préalablement vérifié qu'à ce pH l'hydrolyse acide du saccharose est négligeable par rapport à l'hydrolyse enzymatique (de l'ordre de 1 %).

Les figures 17 et 18 montrent les résultats obtenus : on observe un déplacement de l'optimum de température de + 5°C en + 10°C, ainsi qu'une modification de l'allure de la courbe de température dépendance : l'activité enzymatique immobilisée est moins thermoactivée que l'activité enzymatique libre. L'immobilisation pourrait impliquer une diminution des agitations thermiques relatives (invertase-saccharose). Dans les parties décroissantes des courbes, l'activité enzymatique adsorbée semble plus thermosensible que l'activité de l'enzyme libre. Le phénomène est compliqué par le fait que les températures élevées provoquent vraisemblablement une désorption de l'invertase (voir ci-dessous).

Nous avons essayé de vérifier si le déplacement de l'optimum de température de l'invertase adsorbée était lié à une augmentation de la stabilité thermique. On sait que la fixation covalente d'enzymes sur un support insoluble entraîne parfois une stabilisation vis-à-vis de la dénaturation thermique. Pour cela nous avons incubé le complexe invertase-résine Amberlite IRA 93 à différentes températures pendant 4 heures et 8 heures dans du tampon acétate de sodium 0,01 M pH 4. La résine est alors filtrée et son activité enzymatique mesurée : la figure 19 montre que l'activité adsorbée semble stable à 30°C pendant 8 heures. A des températures supérieures on observe une perte d'activité qui est linéaire avec le temps et qui croît avec la température : à 50°C l'inactivation est pratiquement totale après 8 heures. Comme nous savons que l'invertase en solution reste stable lors d'une incubation analogue, il est très probable que celle-ci a provoqué une désorption de l'enzyme adsorbée sur la résine. Nous avons pu vérifier que lorsque la résine IRA 93 porteuse d'invertase est incubée à 30°C pendant 8 jours dans le même tampon, aucune baisse d'activité enzymatique n'est observée. Cette température a été adoptée pour le fonctionnement du réacteur tubulaire continu (voir paragraphe "Hydrolyse continue en réacteur tubulaire").

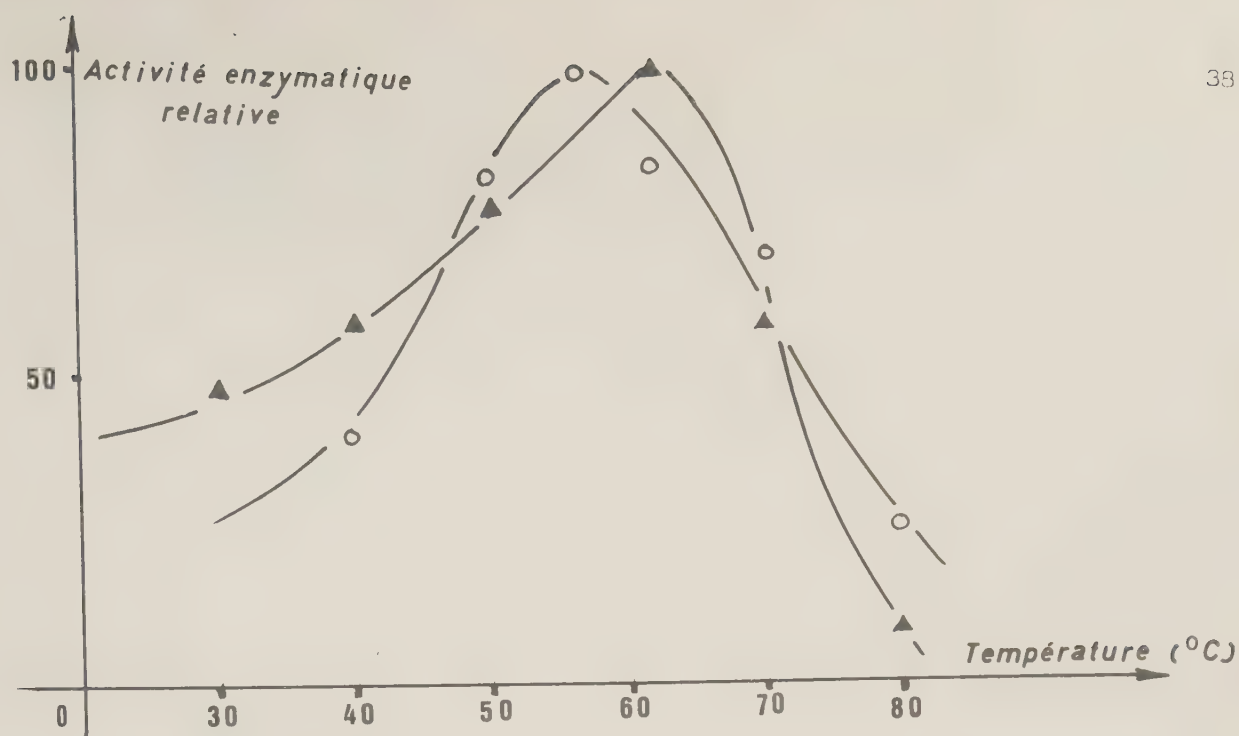


Figure 17

Influence de la température sur l'activité enzymatique initiale. Concentration en saccharose: 10 %. Invertase en solution : tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5 (○ — ○) ; invertase absorbée sur IRA 93, pH 4 (▲ — ▲).

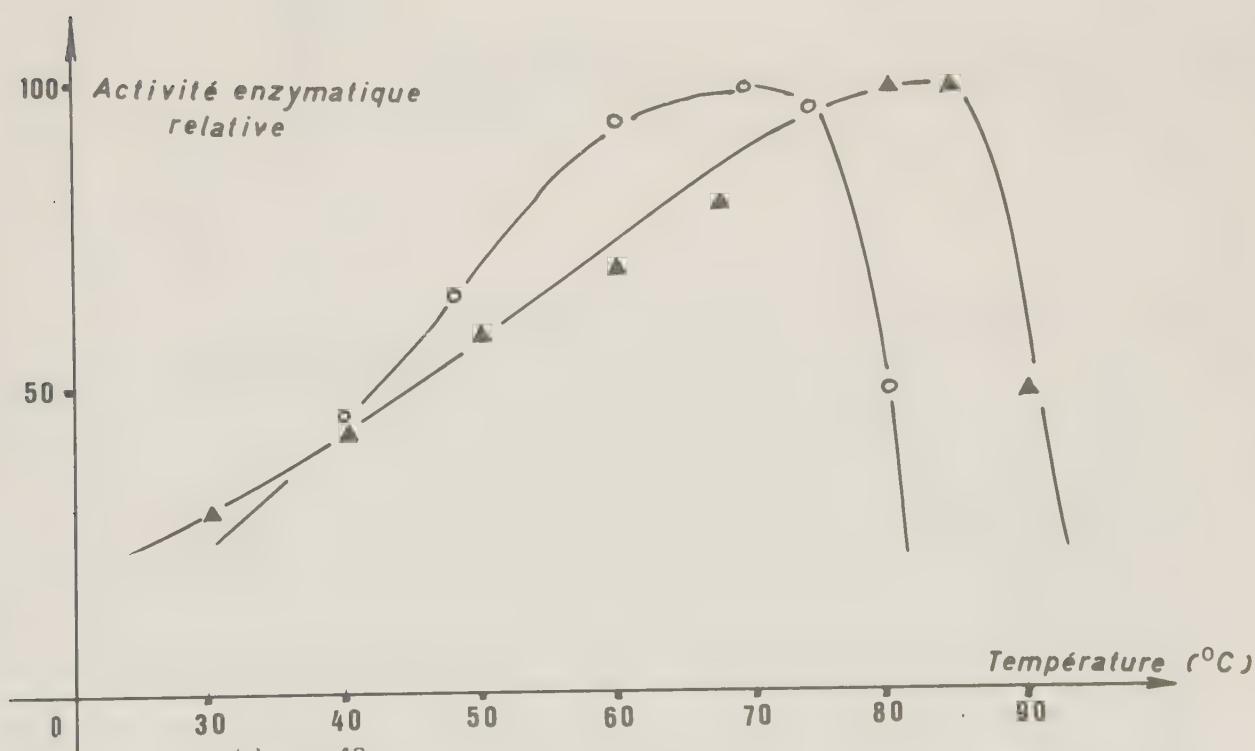


Figure 18

Influence de la température sur l'activité enzymatique initiale. Concentration en saccharose : 60 %. Invertase en solution : tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5 (○ — ○) ; invertase absorbée sur IRA 93, pH 4 (▲ — ▲).

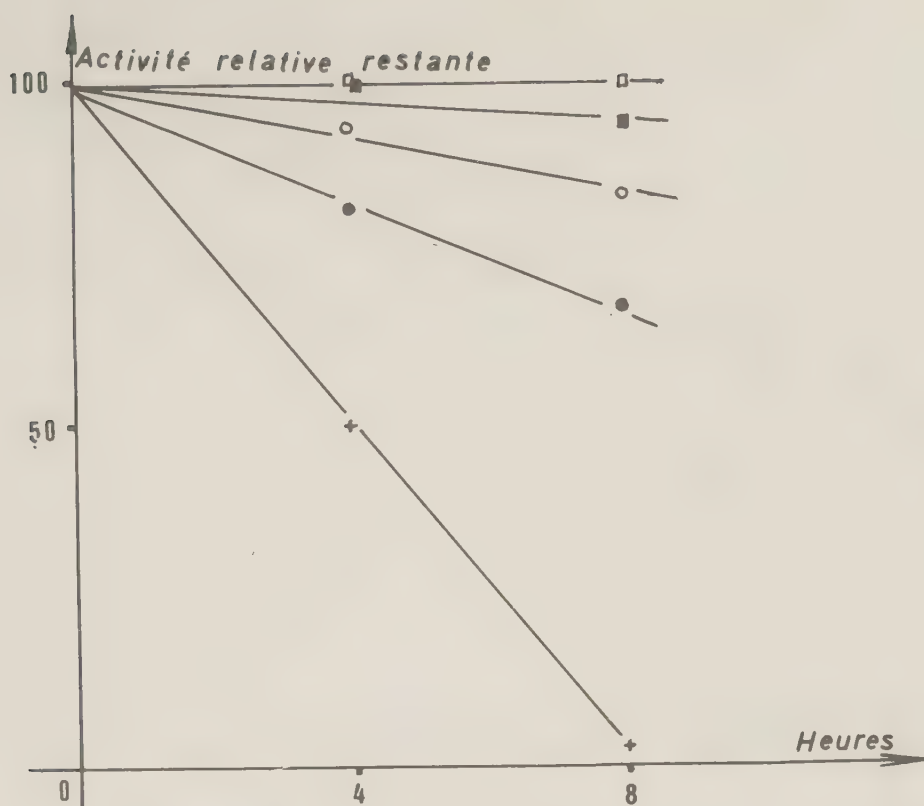


Figure 19

Désorption de l'invertase absorbée sur la résine IRA 93 en fonction du temps dans le tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, à différentes températures : 30°C (□ — □) ; 35°C (■ — ■) ; 40°C (○ — ○) ; 45°C (● — ●) ; 50°C (+ — +).

Effet de la concentration initiale en saccharose sur l'activité de l'invertase adsorbée

La vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose a été déterminée en fonction de la concentration initiale en saccharose en opérant dans un volume de 50 ml contenant 0,5 g de résine enzymatiquement active, à une température de 30°C. La figure 20 indique un déplacement de l'optimum d'activité par rapport à la courbe obtenue avec de l'invertase en solution : à une même activité relative correspond une concentration en saccharose plus faible lorsque l'enzyme est immobilisée.

Dans ce dernier cas, la concentration qui influence l'activité enzymatique n'est pas la concentration de la solution, mais la concentration au niveau du support. L'existence d'une activité enzymatique

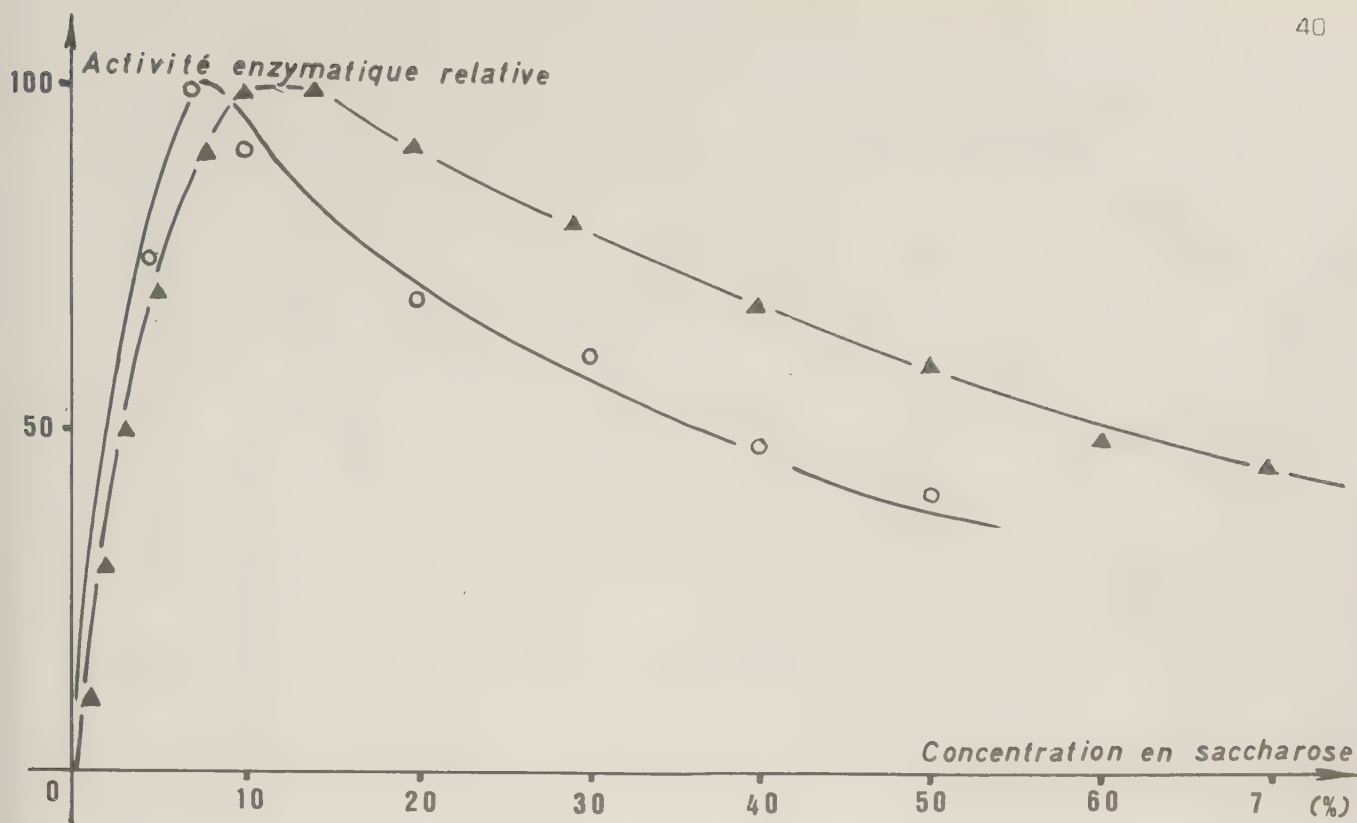


Figure 20

Influence de la concentration en saccharose sur l'activité relative de l'invertase absorbée en solution tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5 ($\blacktriangle$ — $\blacktriangle$) et de l'invertase absorbée sur IRA 93 ($\circ$ — $\circ$) pH 4.

localisée impliquerait une diminution de la concentration en saccharose au niveau de la résine. Le renouvellement ne serait pas immédiat. L'existence d'une couche stagnante influencerait de façon non négligeable le transfert de saccharose au niveau du support enzymatiquement actif.

Cinétique de réaction

Comme le montre la figure 21, la réaction d'hydrolyse du saccharose par de l'invertase adsorbée sur résine suit une cinétique de premier ordre par rapport à la concentration en substrat. L'adsorption ne semble pas modifier la cinétique d'hydrolyse, et ceci rejoint les observations de VIETH et coll. (1972) : la cinétique d'hydrolyse du saccharose par de l'invertase fixée sur du collagène suit une cinétique de premier ordre. La figure 21 montre également que les droites obtenues ne passent plus par l'origine : un temps de latence est nécessaire pour que la réaction se fasse : celui-ci croît avec la concentration en saccharose. L'accessibilité du substrat au site actif de l'enzyme adsorbé est d'autant moins facile que la viscosité de la solution est plus élevée.

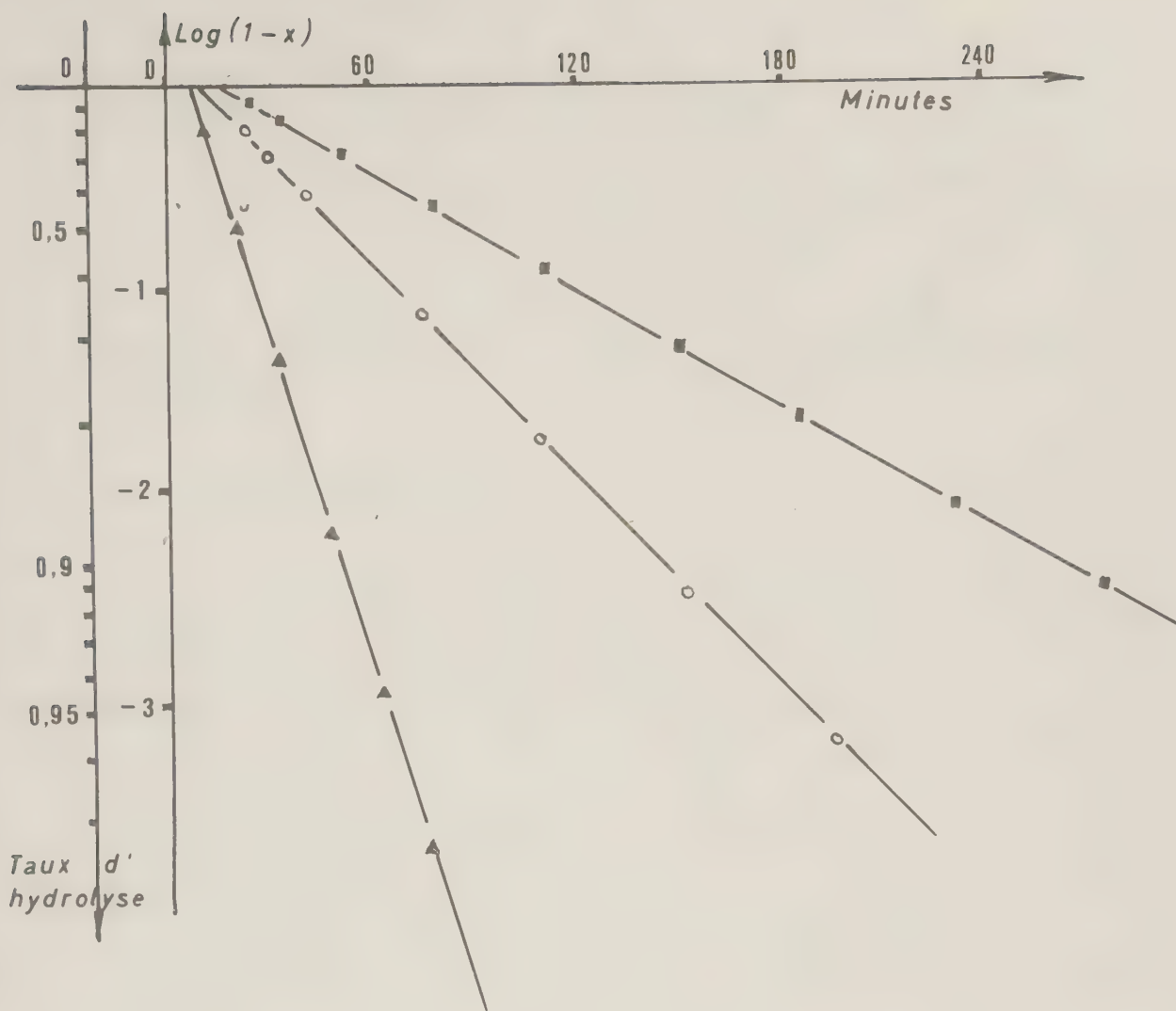


Fig. 21. Cinétique de réaction de l'hydrolyse de saccharose par de l'invertase de levure adsorbée sur la résine IRA 93. Quantité de résine utilisée 1 g, volume réactionnel 50 ml, tampon acétate 0,01 M pH 4, 30°C.

Concentration en saccharose 10 %, $\frac{\text{mg invertase}}{\text{g de résine}} = 5$ (▲—▲)

Concentration en saccharose 30 %, $\frac{\text{mg invertase}}{\text{g de résine}} = 10$ (○—○)

Concentration en saccharose 50 %, $\frac{\text{mg invertase}}{\text{g de résine}} = 20$ (■—■)

C) HYDROLYSES CONTINUES EN REACTEUR TUBULAIRE

Le système que nous avons utilisé est celui représenté sur la figure 4. L'invertase est retenue sur un lit fixe dans un réacteur tubulaire. Comme dans le réacteur à membrane d'ultrafiltration, le milieu réactionnel est dans un état stationnaire, mais substrat et produits de la réaction progressent -idéalement- en tranches parallèles n'échangeant pas de matière entre elles.

Travaux antérieurs

La littérature indique de nombreuses utilisations de systèmes de ce type. BAR ELI et KATCHALSKI (1963) et LILLY (1966) ont retrouvé expérimentalement, en régime michaelien et à l'état stationnaire, la relation théorique entre la fraction de substrat transformé et les paramètres du système (longueur de la colonne, vitesse d'écoulement, constantes cinétiques de la réaction catalysée par l'enzyme fixée). De la même façon MONSAN et DURAND (1971) vérifient avec des solutions diluées de saccharose la cinétique michaelienne de l'hydrolyse par l'invertase. GELLF (1971) établit des équations qui permettent de rendre compte quantitativement des résultats expérimentaux non plus en régime stationnaire, mais en régime d'évolution.

Théorie du réacteur tubulaire

Ainsi que nous l'avons fait pour un réacteur homogène continu, il est possible d'établir une relation entre le taux d'hydrolyse et le temps de résidence pour un réacteur tubulaire. Cependant, dans ce cas, la composition du mélange réactionnel n'est pas uniforme. Le bilan de matière doit être fait sur un élément de volume et l'intégration de l'expression ainsi obtenue doit être faite en tenant compte des conditions à l'entrée et à la sortie du réacteur.

La variation de concentration du saccharose (s) dans un volume dV du réacteur est égale à la somme algébrique de trois termes :

$$\left(\frac{d(s)}{dt} \right)_{dV} = \left(\frac{d(s)}{dt} \right)_{\text{entrée}} + \left(\frac{d(s)}{dt} \right)_{\text{sortie}} + \left(\frac{d(s)}{dt} \right)_{\text{hydrolyse}}$$

$\left(\frac{d(s)}{dt}\right)_{dV}$ est nul lorsque l'état d'équilibre est atteint.

$$\left(\frac{d(s)}{dt}\right)_{\text{entrée}} = \frac{\dot{V}}{dV} (s)$$

$$\left(\frac{d(s)}{dt}\right)_{\text{sortie}} = \frac{\dot{V}}{dV} (s) + d(s)$$

où $\dot{V}$ est le débit à travers le réacteur et dV l'élément de volume considéré du réacteur.

Si l'on suppose que dans les conditions expérimentales adoptées la réaction d'hydrolyse est une réaction de premier ordre, $\left(\frac{d(s)}{dt}\right)_{\text{hydrolyse}}$ est égal à $-k(s)$, où k est la constante de vitesse de réaction de premier ordre par rapport à la concentration en substrat.

La relation précédente s'écrit alors :

$$\frac{\dot{V}}{dV}(s) - \frac{\dot{V}}{dV} (s) + d(s) - k(s) = 0$$

Le calcul aboutit à la relation suivante :

$$\text{Log } \frac{1}{1-x} = k \theta$$

où θ est le temps de résidence de la solution dans le réacteur.

Réalisation pratique du réacteur tubulaire

Afin de réaliser un réacteur tubulaire, nous avons utilisé une colonne Pharmacia type K 9/30. Le lit fixe à l'intérieur de la colonne est constitué par 6 grammes de résine Amberlite IRA 93 sur laquelle a été adsorbée de l'invertase en suivant la méthode précédemment décrite.

Le volume total V_C de la colonne enzymatiquement active est égal à 16 ml.

Le volume mort V_0 du réacteur ainsi constitué a été déterminé d'après le volume d'élution d'une solution de Blue Dextran 2000 : il est égal à 7,5 ml.

Le débit, réglé à l'aide d'une pompe péristaltique (voir figure 4) varie entre 3,76 et 50 ml/mn, ce qui correspond à un temps de résidence variant entre 2 et 0,15 minutes.

Le taux d'hydrolyse est mesuré en sortie de colonne, lorsque

l'état stationnaire est obtenu (généralement après le passage de 100 ml de solution, ce qui représente environ 13 volumes du réacteur).

Expérience d'hydrolyse continue

Nous avons fait deux séries d'expériences et ceci à des concentrations différentes d'invertase.

Dans une première série d'expériences, la quantité d'invertase utilisée lors de l'adsorption est de 3 mg par gramme de résine, et les concentrations des solutions de saccharose employées lors de l'hydrolyse continue sont 10 % et 20 %.

Dans une deuxième série d'expériences, la quantité d'invertase utilisée par gramme de résine est de 40 mg et les concentrations des solutions employées pour l'hydrolyse sont 40 % et 50 %.

Dans les deux cas, le taux d'hydrolyse à la sortie du réacteur est mesuré en fonction du temps de résidence.

Deux observations sont à faire :

Les courbes obtenues ne passent pas par l'origine (figures 22 et 23) : il existerait une limite inférieure du temps de résidence de la solution dans le réacteur en dessous de laquelle l'activité enzymatique serait nulle. Cette limite inférieure semble croissante avec la concentration. Ces résultats sont à rapprocher des périodes de latence observées lors des hydrolyses discontinues.

D'autre part, la figure 23 indique que la variation du $\text{Log} \frac{1}{1-x}$ en fonction du temps de résidence n'est pas linéaire. La pente des courbes obtenues est plus élevée à des temps de résidence faibles (débits élevés) qu'elle ne l'est à des temps de résidence forts (débits faibles). Ce phénomène résulte très probablement de la nature de la catalyse qui, dans ce cas, est hétérogène : le transfert du saccharose au niveau de l'enzyme serait plus efficace à des débits élevés qu'à des débits faibles.

L'explication de ce phénomène est complexe et fait intervenir l'influence des phénomènes de convection, de diffusion et de réaction au niveau du support. Il est très probable que l'influence de chacun d'eux sur la réaction globale est fonction du régime d'écoulement de

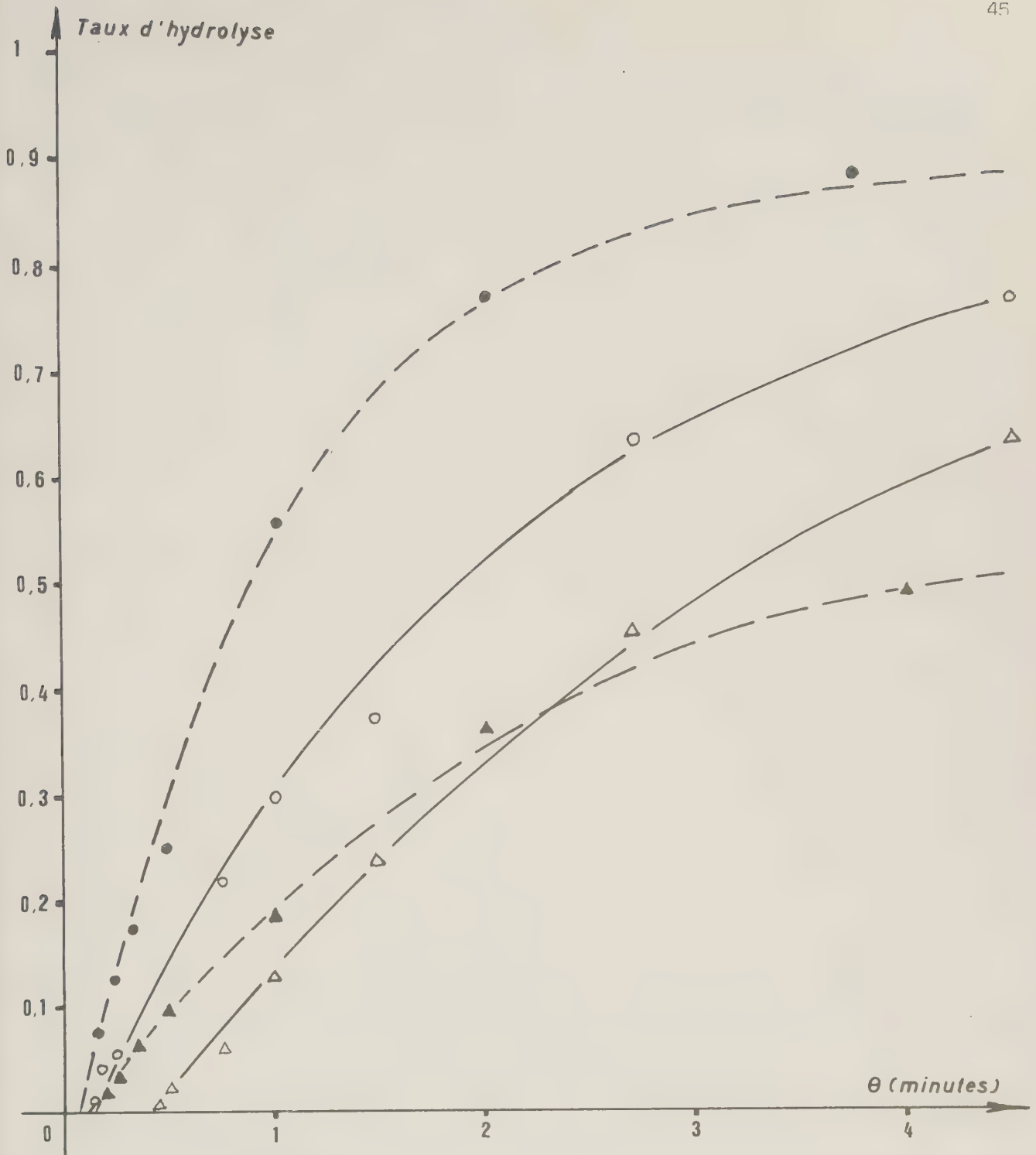


Figure 22

Représentation du taux d'hydrolyse en fonction du temps de résidence.

Tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, 30°C.

Deux séries d'expériences ont été faites :

a) $\frac{\text{mg d'invertase}}{\text{g de résine}} = 3$

concentration en saccharose 10 % (●---●)
20 % (▲---▲)

b) $\frac{\text{mg d'invertase}}{\text{g de résine}} = 40$

concentration en saccharose 40 % (○—○)
50 % (△—△)

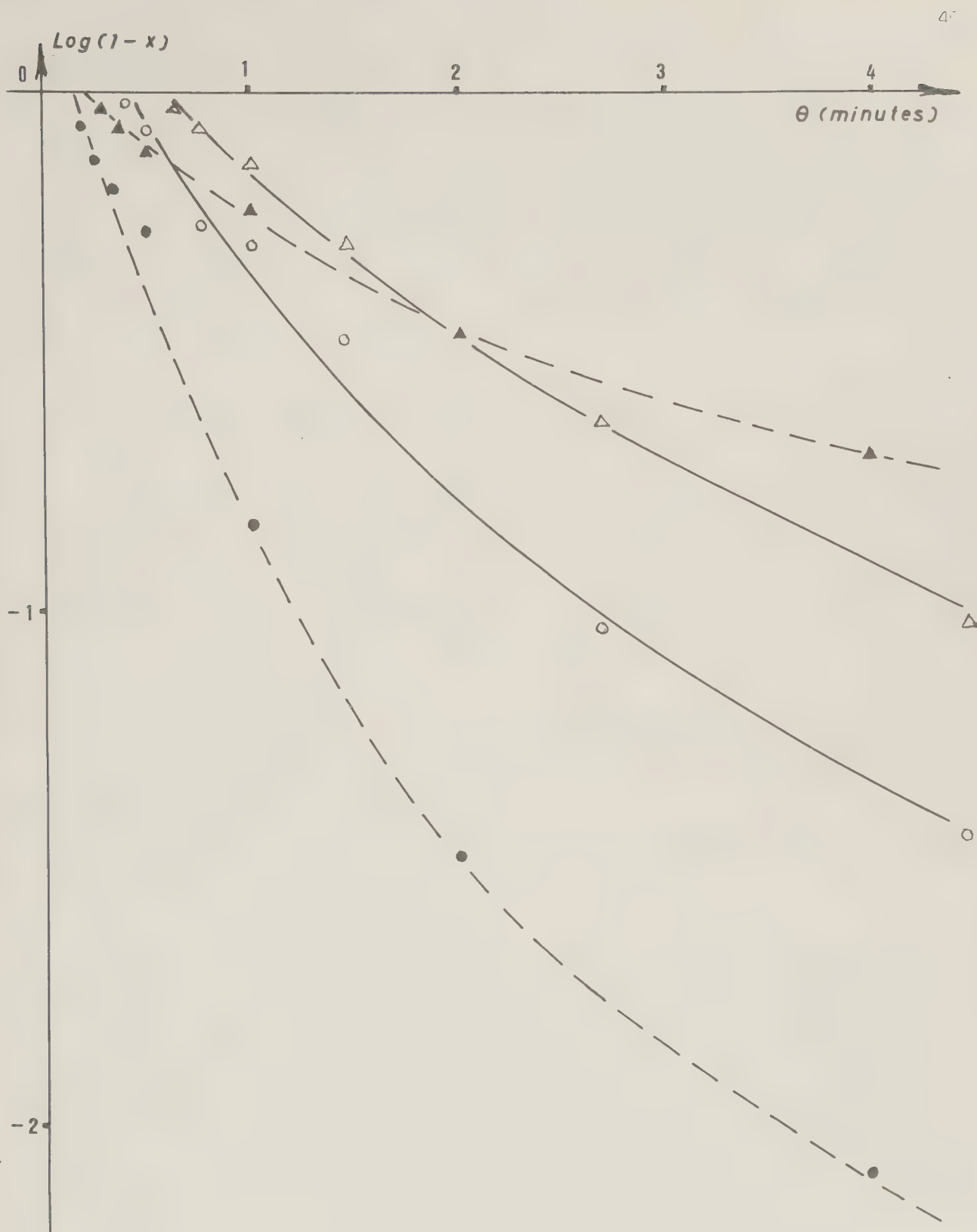


Figure 23

Représentation de $\text{Log.}(1-x)$ en fonction du temps de résidence θ . Les points correspondent à ceux de la figure 22.

la solution dans le réacteur.

Ce régime est en effet caractérisé par la viscosité de la solution et la vitesse interstitielle de celle-ci au niveau du support enzymatique-ments actif. De telles études ont été faites par KOBAYASHI et MOO-YOUNG (1971) en milieu dilué (cinétique michaelienne). Remarquons également que certains auteurs (SHULER et coll. 1972) ont fait intervenir en plus de la diffusion, l'influence des effets électrostatiques sur la modification de la cinétique des enzymes immobilisées.

Utilisation prolongée du réacteur tubulaire

Nous avons réalisé une hydrolyse continue de solution de saccharose de concentration 50 %. La quantité d'invertase mise en contact lors de l'adsorption est de 40 mg par gramme de résine, et le lit fixe de la colonne constitué par 6 grammes de résine. Le débit de solution de saccharose de concentration 50 %, dans le tampon acétate de sodium 0,01 M pH 4 est fixé à 1ml/mn.

La figure 24 indique le volume de solution recueilli en fonction du temps, et le taux d'hydrolyse de cette solution. On voit que ce taux d'hydrolyse, une fois l'équilibre atteint est resté constant et égal à 76 % pendant 190 heures. Ceci montre que l'activité de l'invertase n'est que très peu ou pas désorbée au cours de cette opération.

Des expériences sont actuellement en cours avec des solutions industrielles de saccharose.

Ainsi 240 mg d'invertase ont permis d'hydrolyser à 76 % 5,7 kg de saccharose en 190 heures. Nous avons comparé l'efficacité des deux systèmes d'hydrolyse enzymatique du saccharose étudiés : le réacteur homogène à membrane d'ultrafiltration et le réacteur à écoulement dans lequel l'enzyme est retenue par adsorption, les conditions d'opération étant respectivement 50°C, pH 4,5, et 30°C, pH 4. Le réacteur à membrane d'ultrafiltration a permis d'hydrolyser 2,1 kg à 90 % en 120 heures, la quantité d'enzyme mise dans le réacteur étant 20 mg. Un calcul permet d'évaluer à 0,3 kg la quantité de saccharose hydrolysé à 76 % pendant le même temps et avec la même quantité d'invertase introduite lors de l'adsorption. Le réacteur continu à membrane d'ultrafiltration semble beaucoup plus efficace que le réacteur tubulaire où l'invertase est adsorbée.

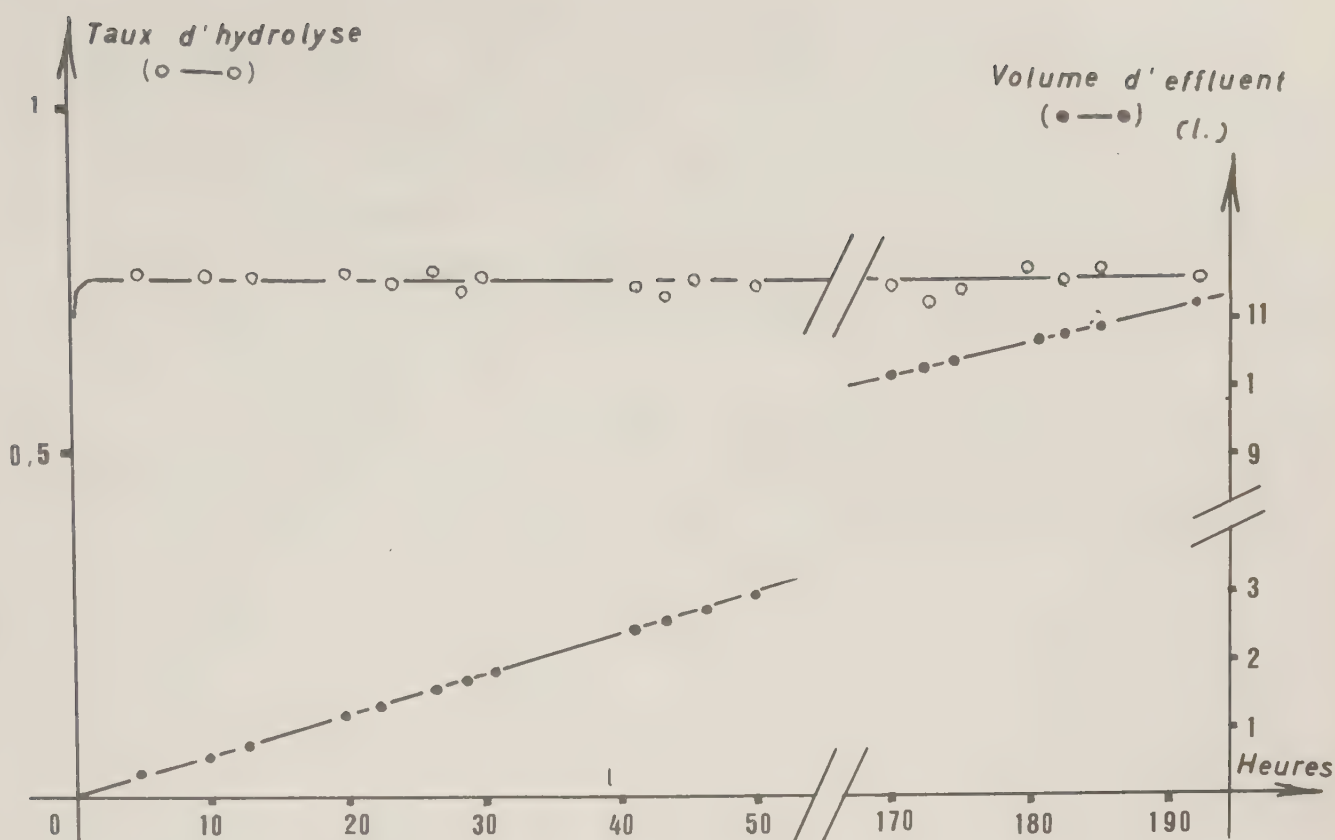


Figure 24

Variation du taux d'hydrolyse lors d'hydrolyses continues du saccharose dans un réacteur tubulaire. L'invertase a été absorbée sur la résine Amberlite IRA 93 ($\frac{\text{mg d'invertase}}{\text{g de résine}} = 40$)

Le montage utilisé est celui de la figure 3. Tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4 ; concentration en saccharose 50 %, 30°C.

En fait ce phénomène n'est qu'apparent et nous avons, afin de l'illustrer, établi la comparaison des efficacités des réacteurs (produits formés par unité de temps) en prenant comme référence soit la quantité d'enzyme introduite dans le réacteur à membrane d'ultrafiltration ou mise en contact lors de l'adsorption sur la résine dans le cas du réacteur tubulaire, soit le volume réactionnel. Dans les deux cas les efficacités peuvent être comparées en quantité de saccharose hydrolysé en 120 heures, les taux d'hydrolyse étant 90 % et 99 %.

Le tableau suivant indique les résultats obtenus par le calcul en supposant que la réaction d'hydrolyse suit une cinétique de premier ordre par rapport à la concentration en substrat (voir les formules établies pour chacun des deux types de réacteurs pages 21 et 43)

	Volume réactionnel (ml)	Quantité d'enzyme (mg)	Saccharose hydro- lysé en 120h (Kg)	
			(a) à 90%	(b) à 99%
Réacteur continu à membrane d'ultrafiltration	50	20	2,1 (*)	0,21
Réacteur Continu tubulaire	16 50	20 750	0,18 6,8 (*)	0,09 3,4

(*) Valeurs expérimentales

La colonne a du tableau (taux d'hydrolyse égal à 90 %) montre que le résultat de la comparaison des efficacités est fonction de la grandeur de référence (quantité d'invertase ou volume réactionnel). Il semble que, en supposant les deux systèmes stables (c'est-à-dire en supposant que l'activité enzymatique reste constante), la grandeur de référence à considérer soit le volume réactionnel et non la quantité d'enzyme introduite. Dans ce cas le réacteur tubulaire est plus efficace.

La colonne b indique ce que deviennent les quantités de saccharose hydrolysé lorsque le taux d'hydrolyse à la sortie des réacteurs est supposé égal à 99 % ; le réacteur tubulaire devient alors encore plus efficace que le réacteur homogène à membrane d'ultrafiltration ; ceci tient à la nature des réacteurs. On peut exprimer ce phénomène mathématiquement en remarquant que lorsque le taux d'hydrolyse x tend vers 1, le rapport $\frac{x}{1-x}$ augmente plus

vite que $\text{Log } \frac{x}{1-x}$. Cette différence d'efficacité est d'autant plus grande que le taux d'hydrolyse est proche de l'unité, condition répondant aux exigences industrielles.

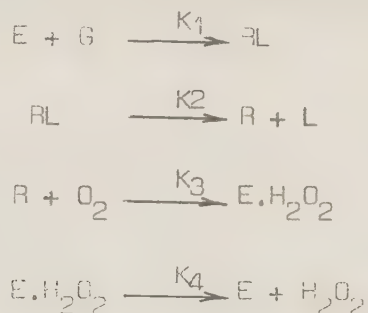
Remarquons cependant qu'à des taux d'hydrolyse faibles l'efficacité du réacteur à membrane d'ultrafiltration sera supérieure à celle du réacteur tubulaire, ceci étant dû d'une part à ce que l'enzyme adsorbée est beaucoup moins active que l'enzyme en solution (en particulier à des concentrations élevées de saccharose) et d'autre part à ce que le produit $\frac{x}{1-x}$. $\text{Log } \frac{x}{1-x}$ tend vers 1 lorsque x tend vers zéro.

CHAPITRE III : OXYDATION CONTINUE DU GLUCOSE A L'AIDE DE LA GLUCOSE OXYDASE

Le troisième modèle que nous avons choisi est celui de l'oxydation du glucose en acide gluconique à l'aide de la glucose oxydase. Ce système a été étudié dans un réacteur continu sans rétention d'enzyme.

La glucose oxydase (EC. 1.1.3.4) d'*Aspergillus Niger* est une glycoprotéine qui contient environ 17 % d'hydrates de carbone (PAZUR et coll., 1963). Cette enzyme contient deux molécules de Flavine Adénine Dinucléotide par molécule (PAZUR et coll., 1965). Son poids moléculaire a été évalué à 186.000 (SWOBODA et MASSEY, 1965) et 150.000 (PAZUR et KLEPPE, 1964). O'MALLEY et WEAVER (1972), récemment, ont montré que la molécule de glucose oxydase est formée de deux chaînes polypeptidiques de même poids moléculaire réunies par des ponts disulfures.

Le mécanisme d'action de la glucose oxydase a été étudié par NAKAMURA et OGURA (1962) et également par GIBSON et coll. (1964). Ce dernier explique la réaction de la manière suivante :



où E est l'enzyme oxydée

L est la gluconolactone

R est l'enzyme réduite

G est le D glucose

RL et $E.H_2O_2$ des complexes entre enzyme d'une part, gluconolactone et H_2O_2 d'autre part.

Afin d'éviter une inactivation de la glucose oxydase par le peroxyde d'hydrogène formé au cours de la réaction, de la catalase a été additionnée au milieu réactionnel (0,1 mg.ml⁻¹). En effet KLEPPE (1966) a montré qu'une concentration 0,05 M en peroxyde d'hydrogène provoquait une

baisse d'activité proche de 80 % : l'inactivation de la glucose oxydase serait due à une transformation par H_2O_2 de certains acides aminés (méthionine oxydée en méthionine-sulfoxyde notamment). L'addition de catalase permet aussi une meilleure utilisation de l'oxygène dissous présent dans le milieu réactionnel.

Remarquons que l'existence d'une glucono- δ -lactanase a été mise en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae* par BRODIE et LIPMANN (1955) et étudiée plus récemment par CONSTATINIDES et coll. (1972).

Signalons que la glucose oxydase est utilisée dans la pratique industrielle pour éliminer l'oxygène de certaines boissons (REED, 1966), ainsi que pour éliminer le glucose présent dans les oeufs - prévention du brunissement non enzymatique- (WIELAND, 1972).

A) INFLUENCE DES CONDITIONS DE REACTIONS SUR LA CINETIQUE

Afin de caractériser la glucose oxydase utilisée, nous avons mesuré l'influence des conditions de réaction sur la cinétique de réaction.

pH

Nous avons vérifié préalablement que dans de l'eau distillée à 30°C, avec ou sans glucose oxydase, la δ -gluconolactone se transforme spontanément et instantanément en acide gluconique. Le pKa de l'acide gluconique a été déterminé et pour des concentrations comprises entre 10^{-3} M et 10^{-1} M (l'intervalle de pH est alors 3,5-2,5).

Celui-ci est égal à 4,0. A des concentrations supérieures, la valeur du pKa calculée diminue : à une concentration M, celui-ci est égal à 3,7. Ces résultats correspondent à ceux de MAY et coll. (1929). Il est probable qu'à des pH assez bas (inférieur à 4), la dissociation de l'acide est plus faible ou que la δ -gluconolactone n'est pas complètement hydrolysée.

Le pH optimum a été étudié avec une solution de glucose oxydase de concentration 0,2 mg/ml, la concentration en glucose étant 0,2 M. Les activités sont mesurées comme indiqué dans "Matériels et Méthodes", le pH étant maintenu constant.

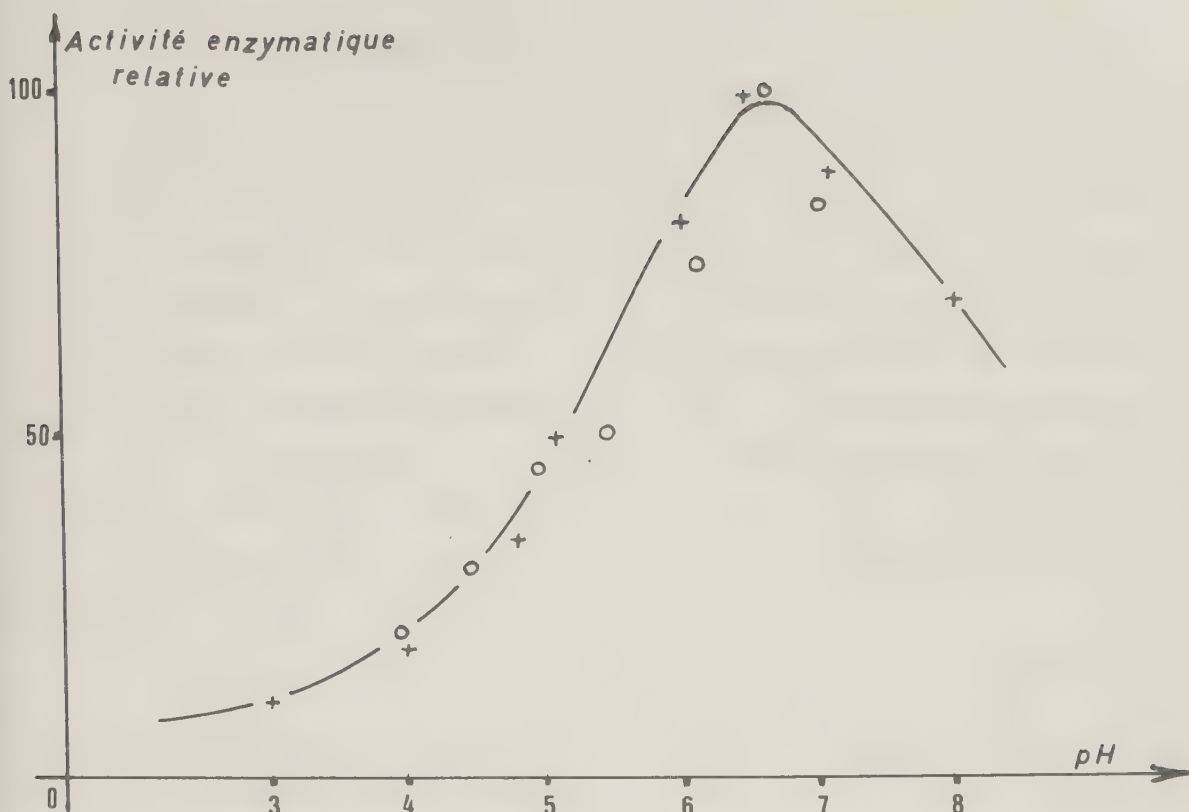


Figure 25

Influence du pH sur l'activité de la glucose oxydase. Tampon phosphate de potassium 0,01 M. Les pH sont ajustés à l'aide de solution d'hydroxyde de sodium et d'acide chlorhydrique (+ — +).

Les points (O) correspondent à une autre méthode de détermination (Cf. paragraphe "Cinétique de réaction" et figure 27).

Comme l'indique la figure 25, une zone de pH optimum est observée vers pH 6,6. Ceci est en accord avec les résultats de Thomas et coll. (1972). On peut faire remarquer que la pH dépendance observée est la résultante des pH dépendances de chacune des étapes de la réaction ; celles-ci ont été étudiées plus en détail par WEIBEL et BRIGHT (1972).

Température

L'influence de la température sur l'activité enzymatique a été étudiée (concentration en glucose oxydase 0,2 mg/ml, solution de glucose 0,2 M dans le tampon phosphate 0,01 M pH 6,6) ; un optimum d'activité est manifeste vers 45°. Comme nous l'avons vu à propos de l'invertase (cf. page 13), la température optimale peut dépendre du temps de réaction ; il est ici de 10 minutes. En fait cet optimum n'est qu'apparent et celui-ci est très probablement déplacé vers des températures supérieures : en effet la concentration en oxygène dissous de la solution diminue lorsque la température s'élève (HOGMANN et coll., 1957) et l'activité enzymatique est une fonction croissante de la concentration d'oxygène dissous (KEILIN et HARTREE, 1948).

Nous avons étudié la stabilité de la glucose oxydase (0,2 mg/ml) dans du tampon phosphate 0,01 M, pH 6,6. L'expérience montre que l'activité enzymatique est stable à 40° pendant 20 heures. Si l'enzyme est incubée à des températures supérieures, on observe une inactivation : ainsi à 45°, au bout de 10 heures, il reste 90 % de l'activité initiale. 40° est la température que nous avons choisie afin de réaliser les expériences continues.

Concentration initiale en glucose

La vitesse initiale d'oxydation du glucose a été déterminée en fonction de la concentration initiale en glucose, en opérant dans un volume réactionnel de 50 ml, avec une concentration de glucose oxydase de 0,08 mg/ml à 40°C (tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 6,6). La concentration en oxygène dissous de ce milieu réactionnel a été déterminée (voir plus loin, paragraphe "Détermination de la concentration en oxygène de solutions saturées") et est approximativement égale à 0,003 g % ml (8.10^{-4} M).

Un maximum d'activité est observé pour une concentration en glucose 0,1 M. Au-delà de cette valeur on observe une décroissance sensiblement linéaire ; pour une solution de concentration 1 M l'activité n'est que la moitié de l'activité maximum.

Le maximum observé correspond aux résultats de NICOL et DUKE (1966) ; ces derniers n'observent cependant une diminution de l'activité

enzymatique en fonction de la concentration en glucose que lorsque la concentration en oxygène est inférieure à $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Selon ces auteurs, cette diminution serait due à la trop lente régénération de la forme oxydée de la glucose oxydase ($K_3 \ll K_1$). Il est probable qu'à ce phénomène se superpose un effet dû à l'augmentation de la viscosité.

Cinétique de réaction

Nous avons étudié la cinétique de réaction d'oxydation du glucose en acide gluconique avec des solutions de glucose de concentration 3,6 % (0,2 M) et 36 % (2 M). Le pH est maintenu constant et égal à 6,6 au cours de la réaction; la normalité (2N) de la solution de soude utilisée permet de considérer la dilution comme négligeable.

La figure 26 montre qu'à de telles concentrations en glucose, la réaction est complète; d'autre part, la vitesse de réaction reste constante pendant la presque totalité de la réaction. La réaction est donc d'ordre zéro. Nous avons supposé que cette période à activité constante correspond à la phase que nous appellerons "stationnaire" de la réaction au cours de laquelle la concentration en oxygène dissous reste stationnaire et inférieure à la concentration initiale (voir paragraphe "Influence de la concentration en glucose-oxydase") et au cours de laquelle la concentration du glucose n'est pas limitante.

Ce résultat, réaction d'ordre zéro, correspond à un comportement cinétique de type michaelien. Nous avons déterminé la constante de Michaelis de la glucose oxydase par rapport au glucose K_{MG} (tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 6,6; 40°C ; concentration en oxygène $8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). La valeur trouvée est $K_{MG} = 1,15 \cdot 10^{-2} \text{ M}$. Cette valeur semble en accord avec celle indiquée par SWOBODA et MASSEY (1965), $K_{MG} = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$.

Ainsi en supposant la concentration en oxygène constante, la vitesse de réaction v peut être exprimée par la relation classique suivante :

$$v = \frac{V_M (G)}{K_M + (G)}$$

où V_M est la vitesse maximum,
et (G) la concentration en glucose.

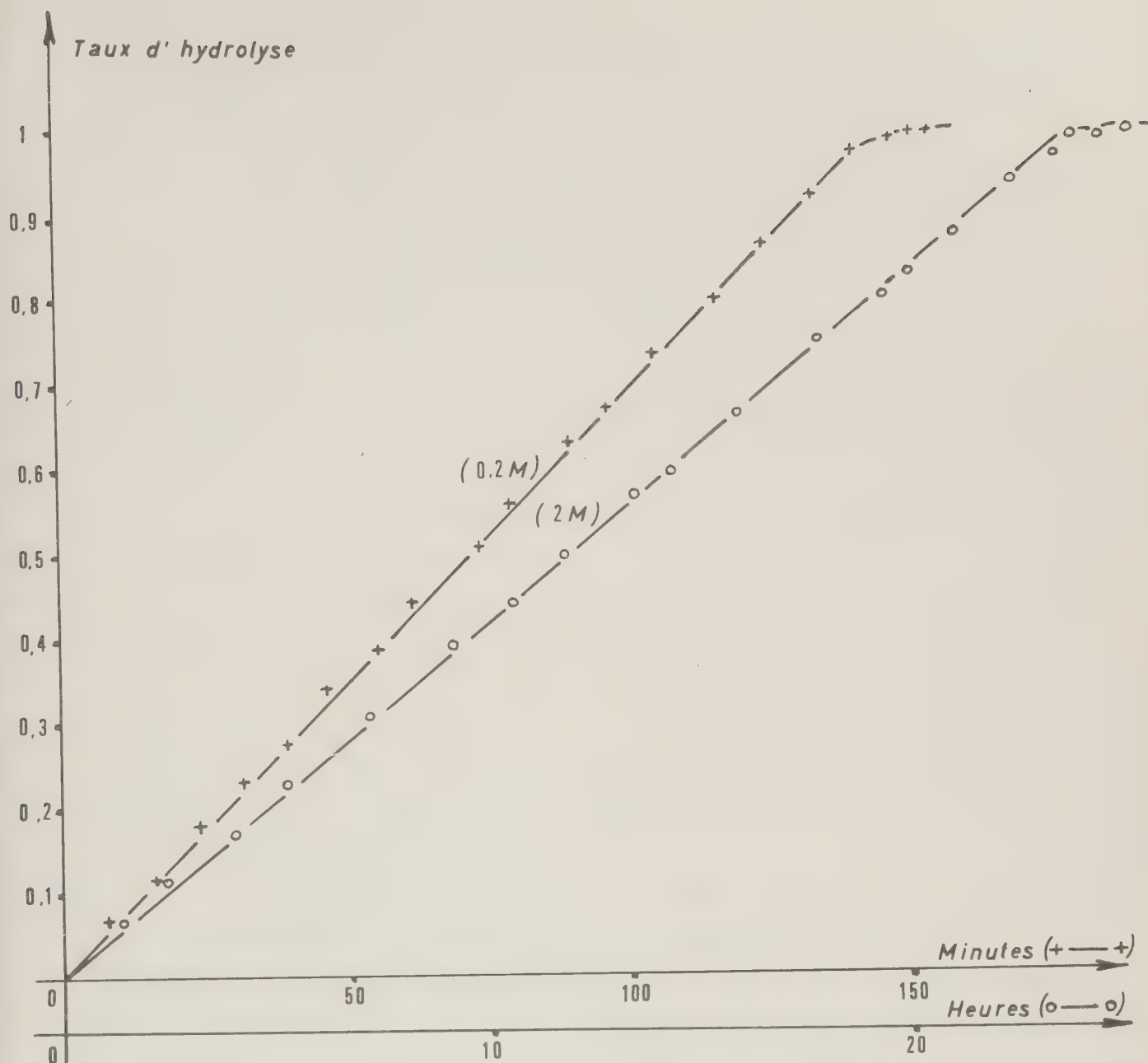


Figure 26

Cinétique de la réaction d'oxydation du glucose par la glucose oxydase.

Tampon phosphate 0,01 M, pH 6,6 ; concentration en glucose oxydase 0,8 mg.ml⁻¹ ; 30°C.

Le taux d'oxydation est la fraction du glucose initial qui a été hydrolysée.

Dans les conditions de l'expérience, la constante de Michaelis devient négligeable par rapport aux concentrations utilisées. La vitesse est constante et la réaction suit une cinétique d'ordre zéro.

Deux remarques peuvent être faites à partir de ces résultats :

- Il est vraisemblable que dans les conditions utilisées, la mutarotation n'influence pas la cinétique de réaction : on sait que la glucose oxydase est spécifique de la forme β du D-glucose ; la transformation de la forme α en forme β est donc probablement plus rapide que la réaction d'oxydation de cette dernière forme ; dans le cas contraire, on observerait une diminution de la vitesse de réaction au cours du temps ;

- Pour la même raison, il ne semble pas y avoir d'inhibition de l'oxydation par l'ion gluconate.

Du fait de la cinétique d'ordre zéro, il est possible de déterminer la courbe de pH dépendance de l'activité en une seule expérience.

Pour cela, nous avons supposé que la cinétique de réaction était d'ordre zéro quel que soit le pH, et nous avons mesuré la disparition du glucose dans une solution 0,2 M en glucose de pH initial 8, en fonction du temps. Le pH du milieu réactionnel correspondant à chacune des prises d'échantillon a été relevé.

La concentration de glucose oxydase employée, égale à 0,1 mg. ml^{-1} est suffisamment faible pour que la réaction se produise lentement et que les mesures expérimentales soient possibles. La figure 27 indique la disparition du glucose(—) et l'évolution du pH en fonction du temps. En tout point de cette courbe la pente $\frac{d(G)}{dt}$ qui représente la vitesse de réaction, ne dépend que du pH. La mesure de la pente permet donc de tracer la courbe de pH dépendance. Celle-ci a été tracée en activité relative (figure 25). La correspondance avec la courbe de pH dépendance déterminée par des mesures à pH constant est relativement satisfaisante. La méthode décrite a l'avantage d'être simple : elle est cependant très imprécise car la détermination du pH optimum repose sur celle du point d'inflexion de la figure 27.

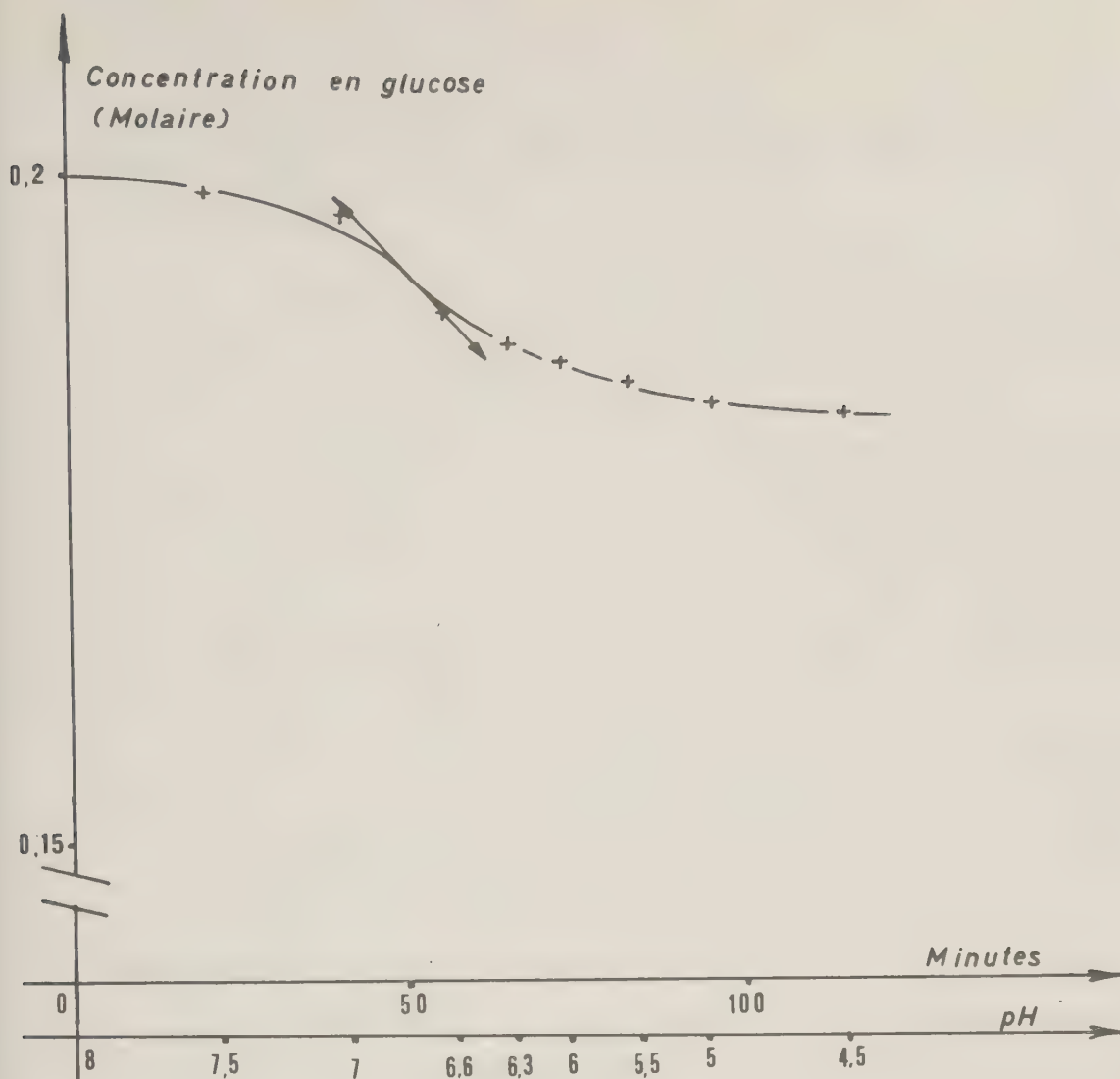


Figure 27

Courbe $[\text{glucose}] = f(\text{temps})$

Tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH initial 8 ; 30°C ; concentration en glucose oxydase 0,05 mg.ml⁻¹.

Concentration en enzyme - Application à la détermination de la constante de Michaelis KM_{O_2}

La vitesse de réaction de la cinétique d'ordre zéro a été mesurée à pH constant et pour des concentrations en glucose oxydase comprises entre 0,1 et 2,5 mg/ml (le temps de réaction est de 20 minutes).

La concentration initiale en glucose est 0,2 M. La concentration initiale de l'oxygène (de l'ordre de $2 \cdot 10^{-3}$ M) est fonction de la température. Les expériences ont été faites à différentes températures comprises entre 3° et 65°. La concentration initiale en oxygène dissous a été déterminée expérimentalement (voir plus loin, paragraphe "Détermination de la concentration en oxygène de solutions saturées").

La figure 28 indique les courbes obtenues ; à de faibles concentrations en glucose oxydase - généralement inférieures à 0,4 mg/ml - l'activité enzymatique est proportionnelle à la concentration en enzyme. Au-delà d'une certaine valeur de la concentration en glucose oxydase - de l'ordre de 0,3 mg/ml - l'activité enzymatique croît moins vite que la concentration en glucose oxydase.

En conséquence, une augmentation de la concentration en glucose oxydase augmente l'activité totale du milieu réactionnel, mais au-delà d'une certaine valeur, l'activité par unité de poids de glucose oxydase diminue. Nous donnons de ce phénomène l'explication suivante : du fait de la réaction il y a un abaissement rapide de la concentration en oxygène dissous de la solution, jusqu'à une valeur d'équilibre maintenue grâce à l'apport d'oxygène. Cet apport est dû à la diffusion de la phase gazeuse vers la phase liquide (l'oxygène gazeux est lui-même fourni par barbotage dans le milieu réactionnel).

La concentration d'oxygène dissous à l'équilibre est fonction de l'activité enzymatique effectivement présente dans la solution : plus celle-ci est élevée, plus celle-là est faible.

A partir des résultats de la figure 28, nous avons déterminé les valeurs des concentrations en oxygène dissous de chacun des états d'équilibre, et essayé ainsi de mesurer de façon indirecte la constante de Michaelis de la glucose oxydase par rapport à l'oxygène.

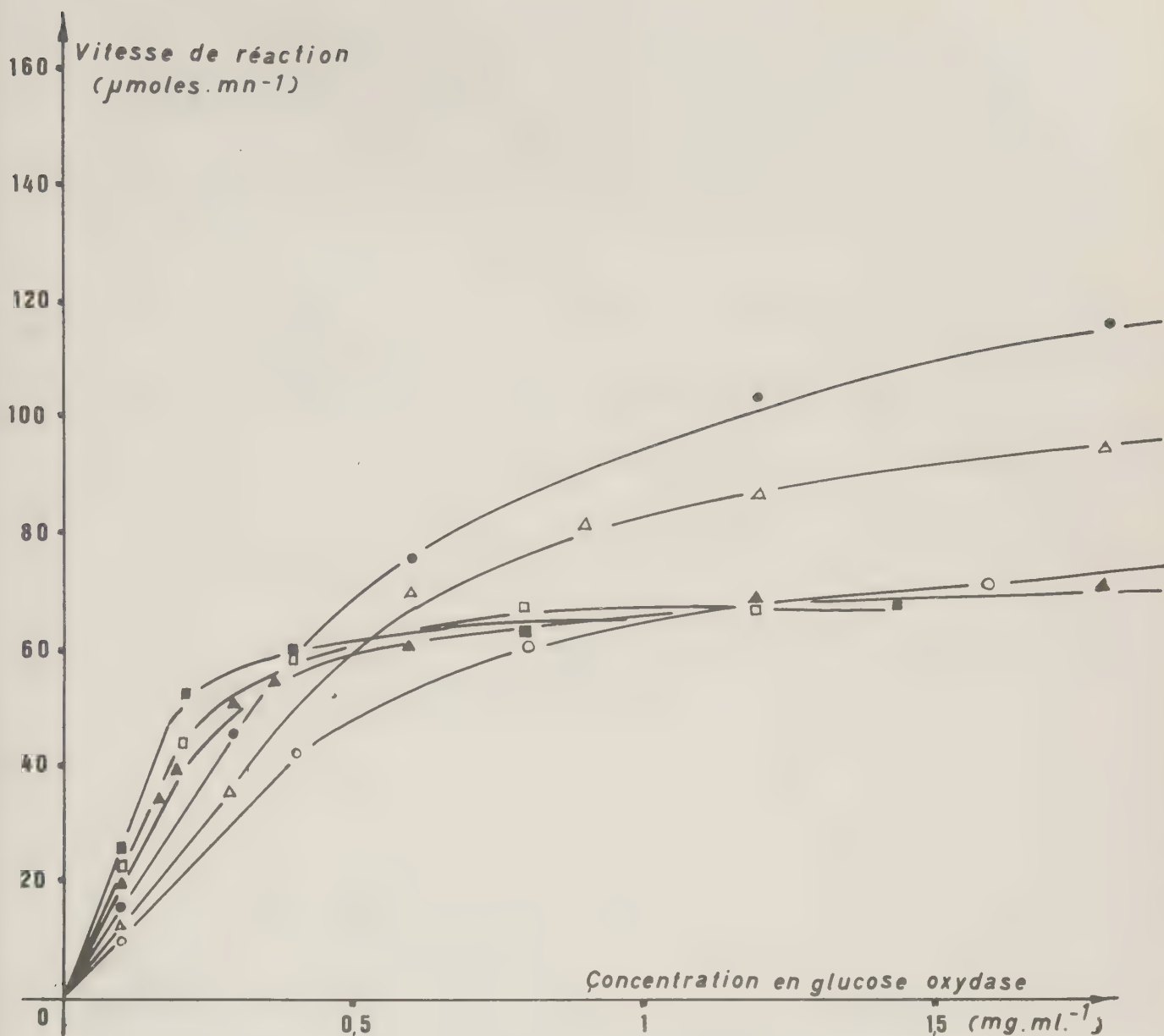


Fig. 28

Activité enzymatique en fonction de la concentration en glucose-oxydase.
 Tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 6,6, solution de glucose 0,2 M,
 volume réactionnel 50 ml.

Température: 3° (○ — ○) ; 12° (● — ●) ; 25° (△ — △) ; 40° (▲ — ▲) ;
 50° (□ — □) ; 65° (■ — ■).

En vue de ce calcul nous avons considéré un élément suffisamment petit de l'interface entre les phases gazeuses (oxygène) et liquide (milieu réactionnel). Le transfert d'oxygène se fait de la phase gazeuse vers la phase liquide. La figure 29 schématise le profil de concentration de l'oxygène, et l'allure du transfert de l'oxygène peut être exprimée par la formule suivante :

$$\left(\frac{d O_2}{dt} \right)_{\text{transfert}} = K_L \cdot a \cdot (n^* - n) \quad (1)$$

où K_L est le coefficient de facilité de transfert de l'oxygène,

a est la surface de contact entre les phases gazeuses et liquides,

n^* est la concentration de l'oxygène de la phase liquide, en équilibre avec la phase gazeuse considérée,

n est la concentration de l'oxygène au sein de la phase liquide dans les conditions de réaction définies.

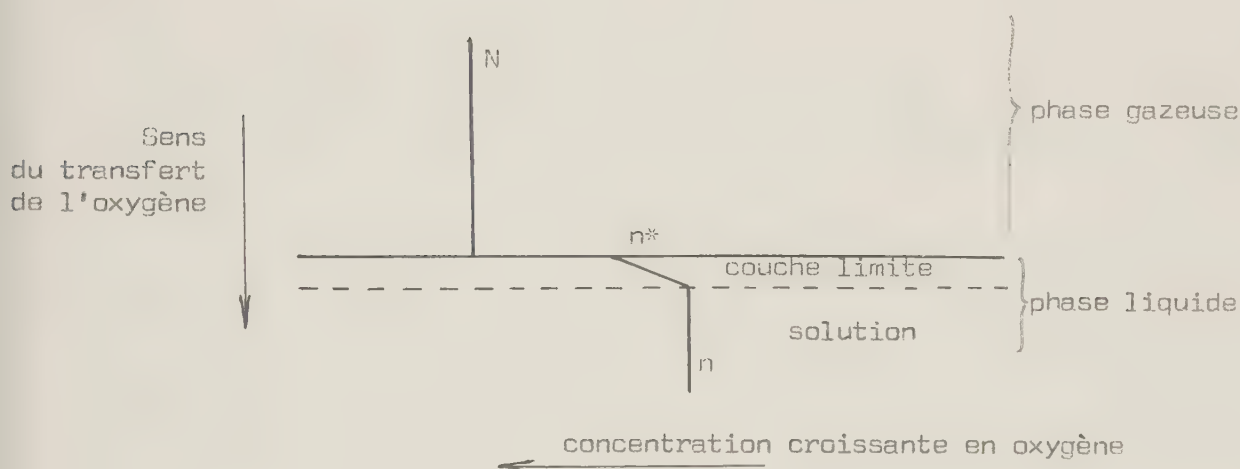


Figure 29 : Représentation schématique du profil de concentration de l'oxygène au voisinage de l'interface gaz - liquide.

Schématiquement la réaction se déroule en deux étapes :

a) une première, probablement très rapide, pendant laquelle la concentration n de l'oxygène dissous dans la solution diminue jusqu'à la valeur d'équilibre et à laquelle correspond une augmentation de l'allure du transfert d'oxygène.

b) une seconde, pendant laquelle la vitesse de réaction et la concentration de l'oxygène dissous sont constantes dans le temps, et qui correspond à la phase "stationnaire" (qui dure tant que l'enzyme est saturé en glucose) de la réaction caractérisée par la relation suivante :

$$\left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{\text{transfert}} = \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{\text{réaction}} = \text{constante} \quad (2)$$

La combinaison des relations (1) et (2) donne

$$\left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{\text{réaction}} = K_1 \cdot a (n^* - n) \quad (3)$$

$$\left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{\text{réaction}} \text{ est déterminé expérimentalement.}$$

La connaissance de n se ramène à celle des facteurs $K_1 \cdot a$, produit du coefficient de facilité de transfert de l'oxygène et de la surface d'échange gaz-liquide, et n^* , concentration en oxygène dissous de solutions saturées.

Ainsi à toute valeur mesurée de l'activité enzymatique pendant la période "stationnaire" (ramenée à la même concentration en glucose oxydase, 0,2 mg/ml) correspond une certaine valeur de la concentration en oxygène dissous. Nous avons déterminé cette valeur et la relation entre ces activités enzymatiques et les concentrations d'oxygène correspondantes nous a permis de calculer de façon indirecte la constante de Michaelis par rapport à l'oxygène de la glucose oxydase.

Détermination de la concentration en oxygène de solutions saturées n^* en fonction de la température

Nous avons déterminé la concentration en oxygène dissous du milieu initial saturé. Cette concentration correspond à n^* . Pour ce faire, nous

avons mesuré le glucose oxydé d'une solution de glucose de concentration connue et saturée en oxygène en présence de glucose oxydase et de catalase, contenus dans une cellule de mesure telle que l'oxygène extérieur ne puisse y pénétrer (cf. figure 30). Cette méthode a déjà été utilisée par GHOSH et coll. (1970) et OKUDA et coll. (1971).

La glucose oxydase catalyse l'oxydation du glucose :



La catalase provoque la décomposition du peroxyde d'hydrogène :



Globalement la réaction s'écrit donc :

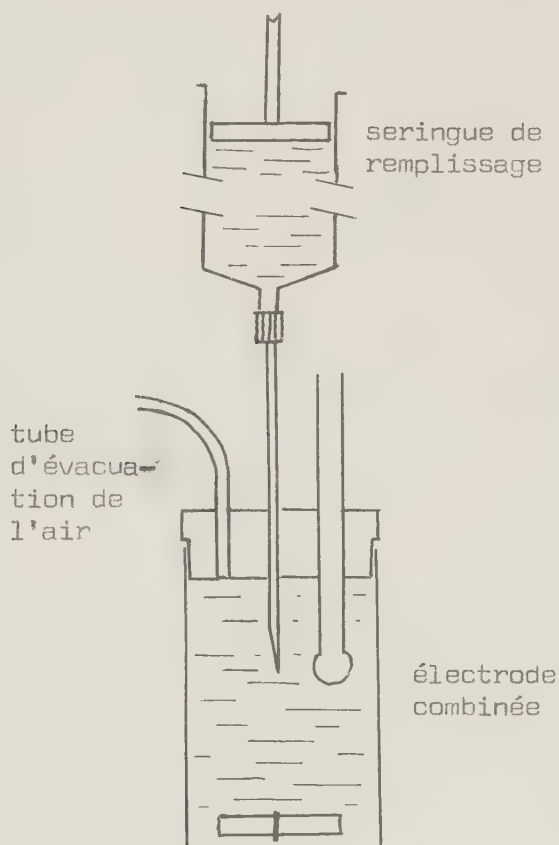


Figure 30

Dispositif utilisé afin de déterminer la concentration en oxygène de solutions saturées en oxygène.

Des solutions de glucose ($4 \cdot 10^{-3}$ M) dans du tampon phosphate 0,01 M, pH 6,6, préalablement maintenues à différentes températures et mises en équilibre avec une atmosphère d'oxygène pur, sont introduites dans un récipient à l'aide d'une seringue de remplissage (volume du récipient 13,7 ml) contenant 10 mg de glucose oxydase et 5 mg de catalase. La mesure du pH permet de savoir quand la réaction cesse d'avoir lieu (l'oxygène n'étant pas renouvelé, la réaction s'arrête lorsque ce substrat est épuisé).

La baisse de concentration du glucose (M/l) mesurée à la fin de la réaction est égale au double de la concentration d'oxygène (M/l) initialement présente dans la solution. En effet, le glucose présent dans le milieu réactionnel étant en excès par rapport à l'oxygène présent, c'est ce dernier qui limite la réaction.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau IX. Les concentrations mesurées sont inférieures à celles indiquées par HODGMANN et coll.; (1957) pour de l'eau à des températures inférieures à 40°.

Température :	10°C	25°C	40°C	50°C	60°C
Molarité O_2 :	$1,2 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$0,8 \cdot 10^{-3}$	$0,45 \cdot 10^{-3}$	$0,43 \cdot 10^{-3}$
Concentration g % ml :	0,0043	0,0032	0,0028	0,0026	0,0025
Concentration indiquée par HODGMANN et coll. g % ml :	0,0053	0,0039	0,0030	0,0026	0,0025

Tableau IX : Variation de la concentration en oxygène de solutions saturées en fonction de la température.

Les valeurs trouvées expérimentalement correspondent à une moyenne calculée sur trois séries de mesure.

Détermination du produit $K_L \cdot a$.

La détermination de la valeur du produit $K_L \cdot a$ (coefficient de facilité de transfert de l'oxygène X surface gaz liquide) a été faite de

la manière suivante :

A partir des valeurs de la figure 28, nous avons porté l'activité enzymatique mesurée en fonction de l'inverse de la concentration en glucose-oxydase. La figure 31 montre les courbes ainsi transformées : les points correspondants aux parties incurbées des courbes de la figure 28 correspondant à des concentrations élevées en glucose oxydase deviennent approximativement alignés. Ce phénomène est intéressant car il permet de calculer l'activité à une concentration en glucose oxydase théoriquement infinie en extrapolant les droites obtenues aux ordonnées correspondant à une abscisse nulle, $\frac{1}{GO} = 0$). Et à cette concentration en glucose oxydase $((GO) = \infty)$, on peut supposer que la concentration en oxygène du milieu réactionnel est nulle.

La relation (3) écrite précédemment devient alors :

$$\left(\frac{d O_2}{dt} \right)_{\text{transfert}} = K_L \cdot a \cdot n^*$$

Cette dernière relation peut être exprimée sous la forme

$$\left(\frac{d O_2}{dt} \right)_{\text{transfert}} = (K_L \cdot a)' \cdot c^*, \text{ où } c^* \text{ est l'oxygène dissous}$$

dans la solution exprimée en % de saturation.

Dans cette expression $(K_L \cdot a)'$ a la dimension mole/litre.seconde. De plus pour chacune des températures choisies C^* est égal à 1 (100 % de saturation). La détermination des valeurs du coefficient global $(K_L a)'$ est alors immédiate.

Température :	3°	12°	25°	40°	50°	65°
$(K_L \cdot a)'$	:	:	:	:	:	:
	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$2,7 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$
mole/litre-minute	:	:	:	:	:	:

Tableau X : Valeur du produit $(K_L \cdot a)'$ pour l'oxygène en fonction de la température. Les mesures sont faites dans un réacteur de 50 ml. Le débit d'oxygène est 1 l/mn.

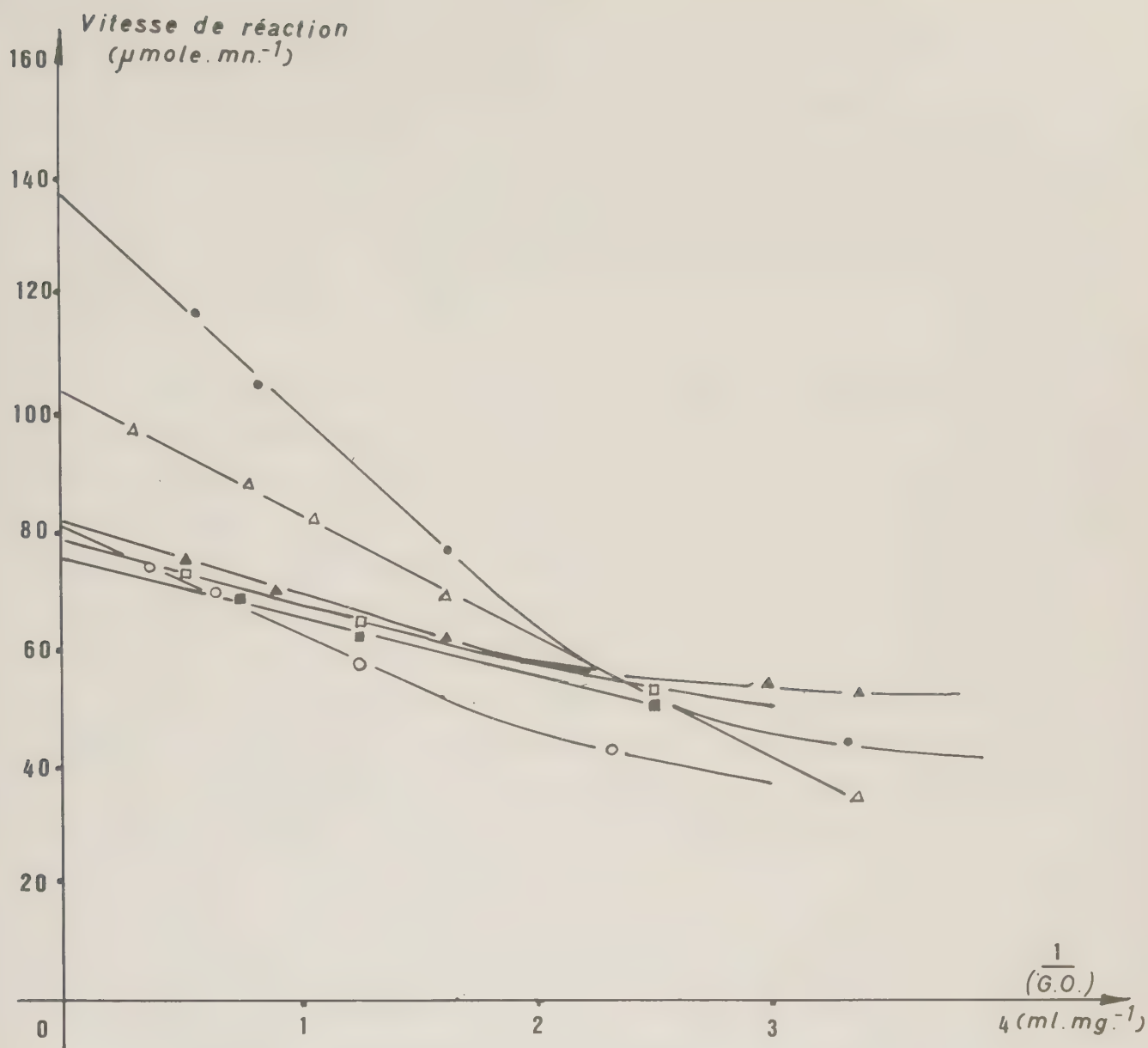


Figure 31. Détermination des coefficients de transfert de l'oxygène $K_L a$ en fonction de la température. Les valeurs utilisées sont celles de la figure 28.

Les valeurs rassemblées dans le tableau X montrent que le coefficient global ($K_L a$) diminue lorsque la température augmente.

Toutes ces expériences ont été faites à agitation constante. On sait en effet que l'agitation influence le transfert d'oxygène. HSIEH et coll. (1969), en utilisant le même système (glucose, glucose oxydase) ont récemment mis en évidence une augmentation du coefficient de facilité de transfert de l'oxygène avec l'agitation.

Détermination des concentrations en oxygène n correspondant à chacun des états d'équilibre

La détermination nécessaire des activités enzymatiques "stationnaires" ($\frac{dO_2}{dt}$ réaction, des concentrations en oxygène des solutions saturées n^* , et des coefficients globaux ($K_L a$) aux différentes températures, permettent de déterminer les concentrations de l'oxygène dissous correspondant à chacun des états "stationnaires", à l'aide de la relation (3).

La figure 32 indique les résultats obtenus : on observe que pour des concentrations en glucose oxydase de plus en plus élevées, la concentration en oxygène dissous du milieu réactionnel à l'état stationnaire diminue. Cet abaissement présente une allure approximativement identique, quelle que soit la température.

Détermination de la constante de Michaelis par rapport à l'oxygène de la glucose oxydase

A chacun des états d'équilibre caractérisé par une concentration en oxygène dissous donnée, on peut faire correspondre la valeur de l'activité enzymatique ramenée à la concentration de 0,2 mg/ml de glucose oxydase ; on peut alors porter $\frac{1}{V}$ en fonction de $\frac{1}{(S)}$ selon LINEWEAVER et BURK (1934).

La figure 33 montre que les points correspondants aux différentes températures sont alignés. La détermination des constantes de Michaelis est immédiate : dans l'intervalle de température considérée ($3^\circ - 65^\circ$) celles-ci sont voisines de $K_{M_{O_2}} = 5.10^{-4}$ M. Nous pouvons comparer la valeur de ce résultat à celui indiqué par GIBSON et coll. (1964), $K_{M_{O_2}} = 2,0.10^{-4}$ M. Ces auteurs ont fait varier la concentration de l'oxygène dans l'atmosphère au-dessus du milieu réactionnel et utilisé l'appareil de Warburg pour la déter-

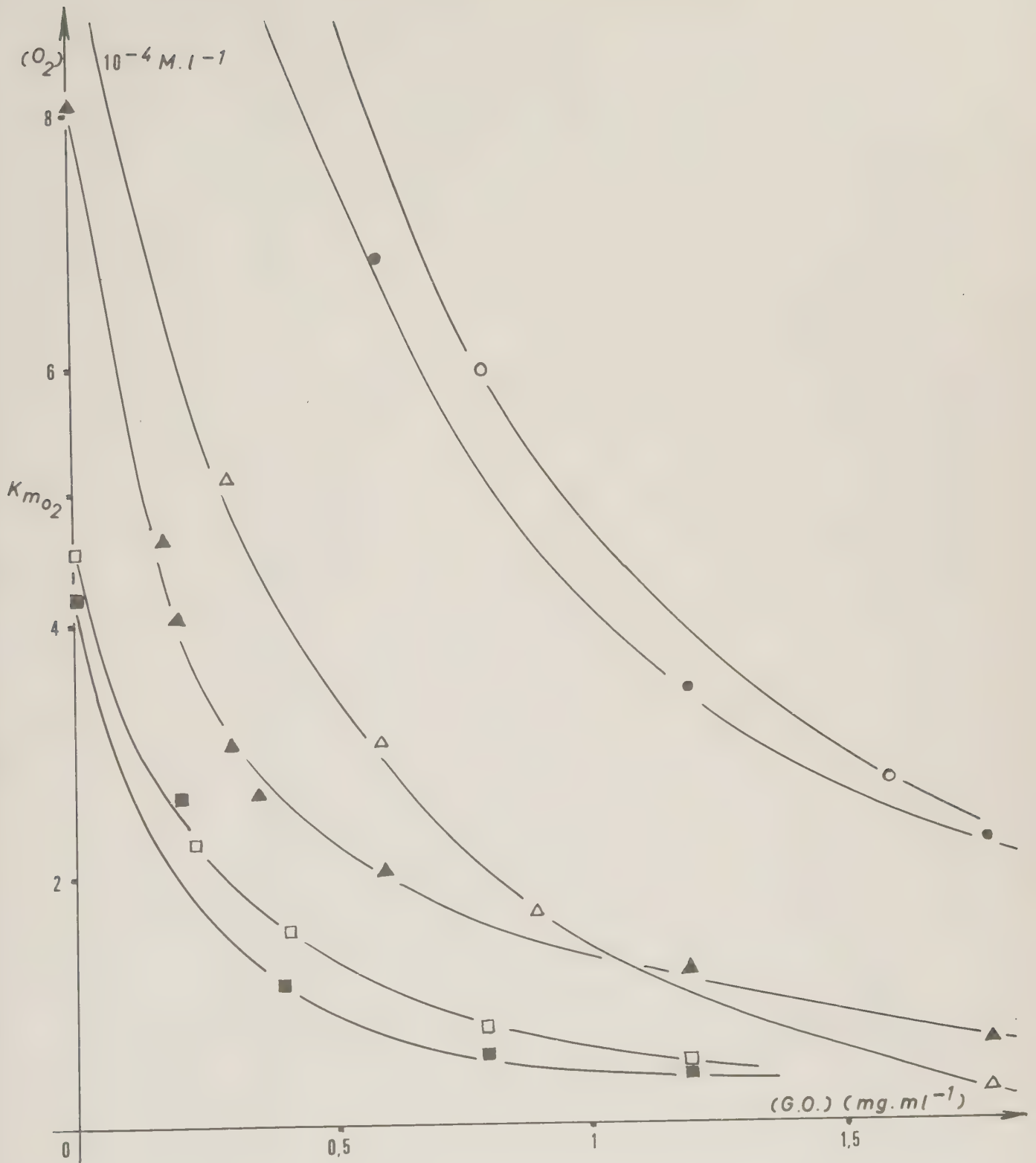


Figure 32

Détermination des concentrations en oxygène n correspondant à chacun des états d'équilibre.

Les points représentés sur la figure ont été calculés à l'aide de la formule

$$\left(\frac{d_{O_2}}{dt}\right) = K_L a (n^* - n). \text{ Températures: } 3^\circ (\circ - \circ) ; 12^\circ (\bullet - \bullet) ; 25^\circ (\triangle - \triangle) \\ 40^\circ (\blacktriangle - \blacktriangle) ; 50^\circ (\square - \square) ; 65^\circ (\blacksquare - \blacksquare).$$

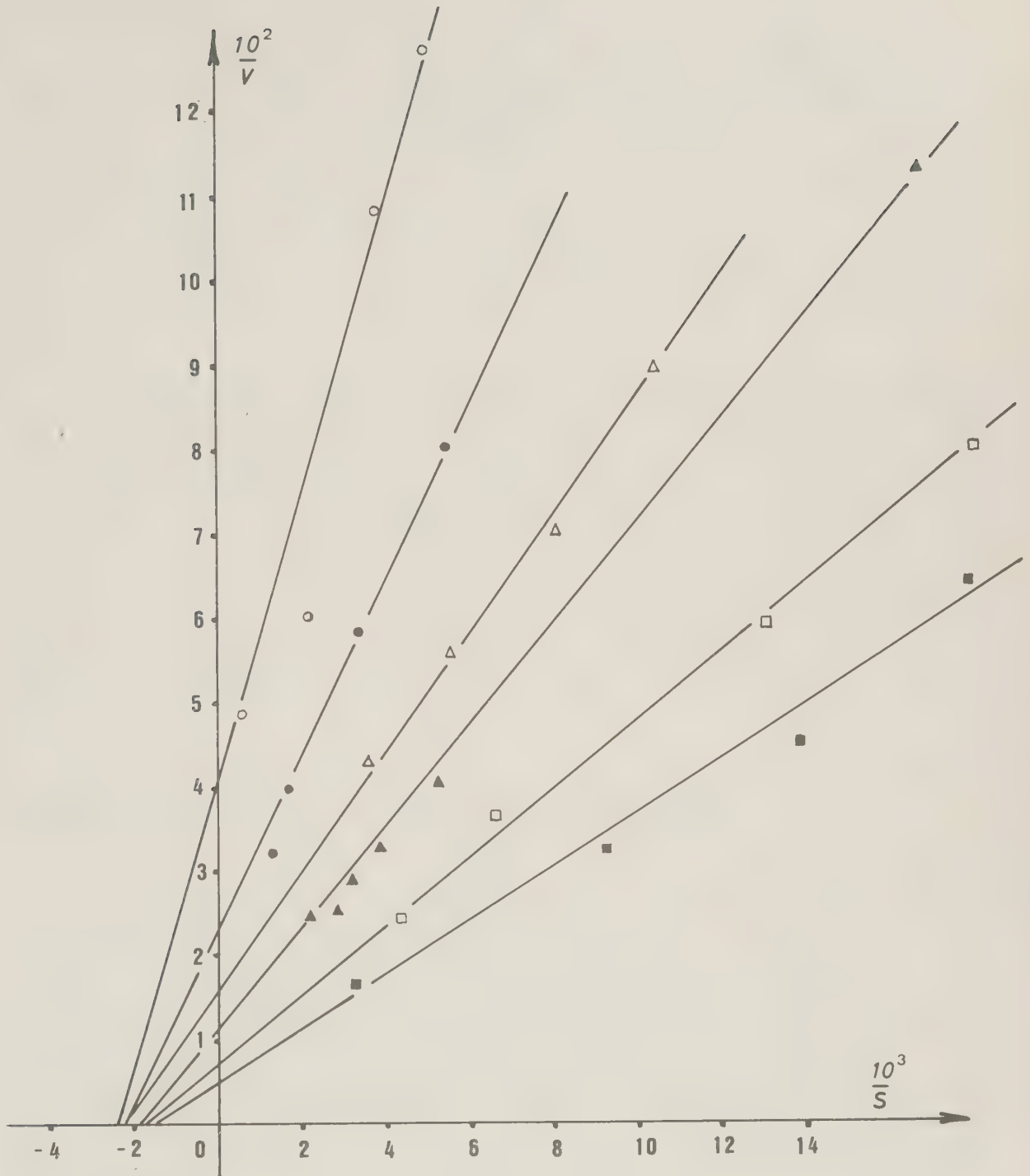


Figure 33

Détermination, à l'aide de la représentation de LINEWEAVER et BURK (1934), de la constante de Michaelis de la glucose oxydase par rapport à l'oxygène $K_{M_{O_2}}$ en fonction de la température.

Tampon phosphate 0,01 M, pH 6,6 ; concentration en glucose 0,2 M ; températures: 3° (o — o) ; 25° (Δ — Δ) ; 40° (▲ — ▲) ; 50° (□ — □) ; 65° (■ — ■).

mination de K_{MO_2} à pH 5,6 et à 25°.

La détermination de K_{MO_2} nous indique la valeur de la concentration en oxygène pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de la vitesse maximum. Or d'après les valeurs des concentrations en oxygène dissous correspondant à la phase "stationnaire" reportées sur la figure 31 (ces concentrations sont dans la plupart des cas inférieures à la valeur de K_{MO_2} : la vitesse de réaction mesurée n'est pas la vitesse de réaction maximum et l'oxygène constitue donc le facteur limitant de la réaction.

Nous n'avons pas interprété les résultats qui semblent pouvoir être tirés de la figure 33, K_M et V_M fonctions de la température. En effet les interprétations de telles variations sont très délicates surtout lorsqu'il s'agit de réactions complexes telles que celles mises en jeu lors de l'oxydation du glucose par la glucose oxydase (DIXON et WEBB, 1958). Dans ce cas, V_M et K_M sont des fonctions complexes de plusieurs constantes de vitesse, et l'influence de la température sur ces constantes est fonction des influences de la température sur chacune de ces constantes.

B) OXYDATION CONTINUE DU GLUCOSE EN REACTEUR HOMOGÈNE

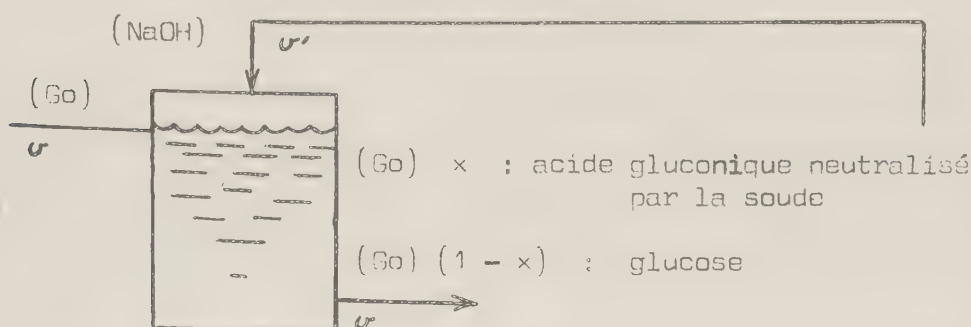
Afin de réaliser une oxydation continue du glucose par la glucose oxydase, nous avons choisi d'opérer en réacteur continu homogène. Ce type de réacteur permet un apport constant d'oxygène par barbotage.

La réaction a été réalisée soit à pH constant, soit sans régulation du pH. Une solution de glucose 0,35M a été choisie afin de comparer les résultats de ces deux séries d'expériences ; nous avons en effet préalablement vérifié que, sans régulation de pH, une solution de cette concentration en glucose peut être oxydée à 100 % par la glucose-oxydase tandis que l'oxydation de solutions de concentrations supérieures n'est pas complète du fait de l'abaissement de pH. Les autres conditions expérimentales retenues sont les suivantes : 40°C, concentration en glucose oxydase : 0,2 mg/ml. A pH 6,6, l'activité enzymatique est 8.10^{-3} V moles/minute, V étant le volume réactionnel en litre.

Oxydation continue à pH constant

Le système utilisé est celui de la figure 4. En plus de l'alimentation continue en solutions de glucose et de glucose-oxydase, une solution d'hydroxyde de sodium (2N) est ajoutée automatiquement à l'aide d'un pH stat, afin de maintenir le pH constant et égal à 6,6.

La figure suivante schématise le système



où V est le volume du réacteur,
 $(NaOH)$ la molarité de la solution de soude,
 v' le débit de la solution de soude,
 (Go) la molarité de la solution de glucose,
 v le débit de la solution de glucose,
 x le taux de conversion.

La quantité de soude ajoutée par unité de temps est égale à la quantité d'acide gluconique sortant du réacteur ; on a donc la relation suivante

$$(NaOH) \cdot v' = (Go) \cdot x \cdot v$$

On peut définir un coefficient de normalité β tel que

$$\beta = \frac{(Go)}{(NaOH)}$$

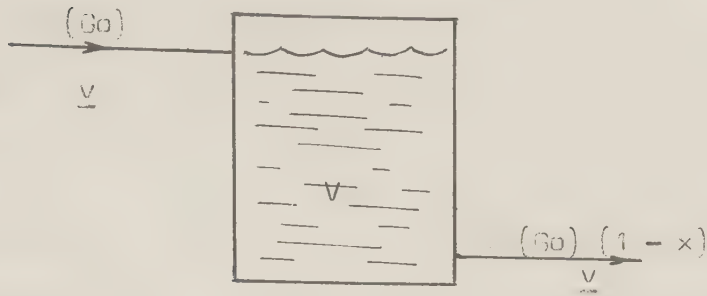
A l'état stationnaire, le débit de soude est $v' = \beta \cdot v \cdot x$

Le volume dans le réacteur étant maintenu constant, il s'établit un état d'équilibre à l'intérieur du réacteur. Celui-ci est caractérisé par une dilution de la solution initiale due au début de soude.

Nous définissons un terme de correction ou coefficient de dilution δ , tel que

$$\delta = \frac{1}{1 + x}$$

Le système peut alors se résumer par le schéma suivant :



Dans les conditions où l'on opère, la concentration en glucose est telle que l'enzyme soit saturée, l'activité enzymatique est proportionnelle à la concentration en glucose oxydase, la constante de vitesse de réaction d'ordre zéro dans le réacteur est multiplié par le coefficient de dilution .

Ainsi que nous l'avons fait précédemment (cf. pages 21 et 42) il est possible d'établir une relation entre le taux de conversion et le temps de résidence de la solution dans le réacteur.

La variation instantanée de concentration (G) à l'intérieur du réacteur est égal à la somme algébrique des variations de concentration dues à l'entrée de glucose, à la sortie de glucose, et à la réaction d'oxydation.

$$\left(\frac{d(G)}{dt} \right)_{\text{réacteur}} = \left(\frac{d(G)}{dt} \right)_{\text{entrée}} + \left(\frac{d(G)}{dt} \right)_{\text{sortie}} + \left(\frac{d(G)}{dt} \right)_{\text{réaction}}$$

$$\left(\frac{d(G)}{dt} \right)_{\text{entrée}} = \frac{v}{V} (G_0)$$

$$\left(\frac{d(G)}{dt} \right)_{\text{sortie}} = - \frac{v}{V} (G_0)(1-x)$$

La réaction étant d'ordre zéro,

$$\left(\frac{d(G)}{dt} \right)_{\text{réaction}} = - \delta . K$$

$$\left(\frac{d(G)}{dt} \right)_{\text{réacteur}} \text{ est nul lorsque l'état d'équilibre est atteint.}$$

La relation précédente s'écrit :

$$0 = \frac{v}{V} (G_0) - \frac{v}{V} (G_0) (1-x) - \delta K$$

Le calcul aboutit à l'équation :

$$\delta . K . \theta = (G_0) \times$$

θ étant le temps de résidence de la solution dans le réacteur.

Nous avons comparé les résultats expérimentaux à la théorie.

Dans la série d'expériences que nous avons faites, la normalité de la soude est 2N. La concentration initiale (G_0) de glucose dans le liquide d'alimentation est 0,35 M, celle de la glucose oxydase 0,2 mg/ml. La température est 40°C. Le temps de résidence nominal est variable d'une expérience à l'autre. Le volume du mélange réactionnel est maintenu constant à l'aide d'un trop plein.

La figure 34 rassemble les résultats. La droite en trait continu est la droite théorique répondant à l'équation :

$$8.10^{-4} . \delta . \theta = 0,35 X$$

Si les points expérimentaux semblent s'aligner sur une droite de pente légèrement supérieure, les résultats expérimentaux compte tenu du nombre restreint de déterminations, sont proches des points théoriques. Ces résultats montrent également que le temps de résidence de la solution dans le réacteur pour avoir une conversion proche de 95 %, est très long et proche de 500 minutes. Comme nous l'avons vu précédemment, une augmentation de la concentration en glucose oxydase ne provoquerait pas une augmentation de l'activité enzymatique suffisante afin de diminuer ce temps de résidence.

Oxydation continue à pH non constant

Le système utilisé est celui de la figure 2. Le réacteur agité est alimenté en continu avec des solutions de glucose et de glucose oxydase. La concentration du glucose équivalente dans le réacteur est toujours 0,35 M. Celle de la glucose oxydase 0,2 mg.ml⁻¹. La température est 40°C. Le temps de résidence nominal θ de la solution est variable d'une expérience à l'autre et le volume réactionnel maintenu constant à l'aide d'un trop plein.

La figure 35 rassemble les points expérimentaux. La comparaison des figures 34 et 35 montre que dans les conditions de la réaction, la régulation de pH est nécessaire pour conserver une activité élevée au-delà d'un temps de résidence de 300 minutes : l'efficacité du réacteur est alors beaucoup moins grande lorsque le pH n'est pas maintenu constant.

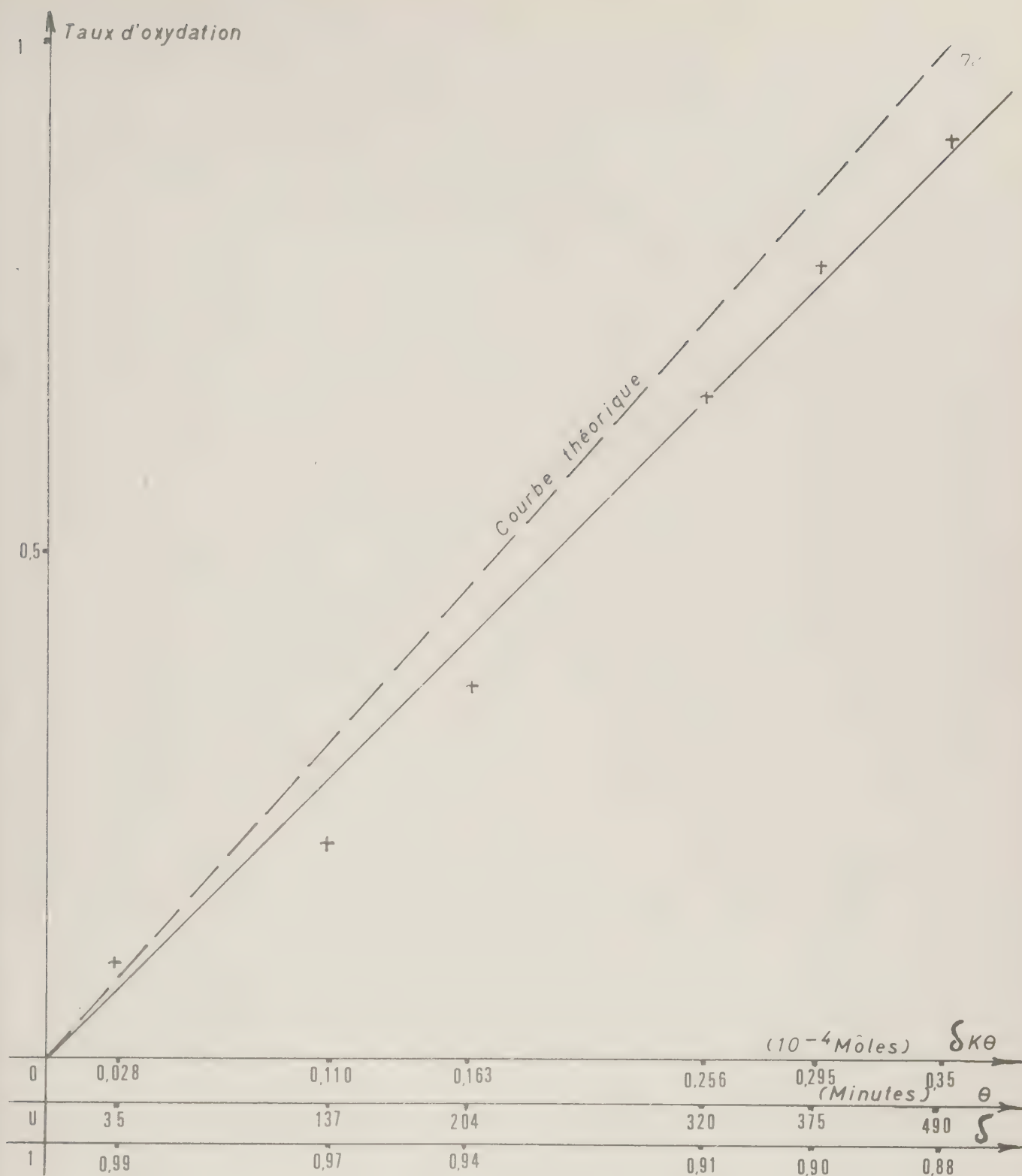


Figure 34

Représentation du taux d'oxydation continu du glucose en fonction du produit $\delta K \theta$. δ est le coefficient de dilution, K la constante de vitesse de réaction ($M. n^{-1}$), θ le temps de résidence (minutes). Le montage utilisé est celui de la figure 2 et le pH est maintenu constant.

Concentration en glucose oxydase $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$; tampon phosphate de potassium $0,01 \text{ M}$, pH 6,7. La courbe théorique répond à l'équation $\delta K \theta = (G_0) \times$ la courbe (+ — +) relie les points expérimentaux.

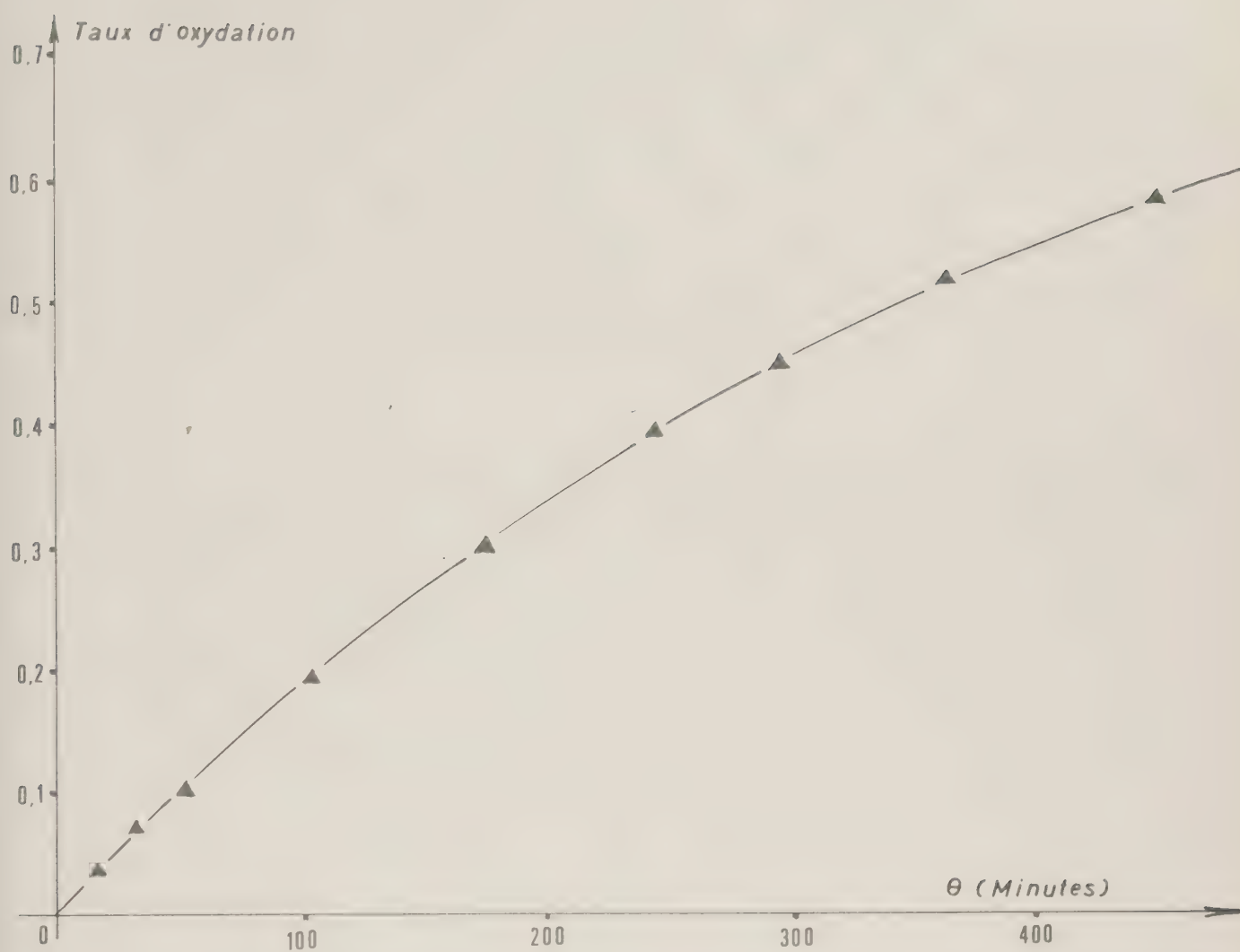


Figure 35

Représentation du taux d'oxydation continu du glucose en fonction du temps de résidence θ . Le montage utilisé est celui de la figure 2. Le pH n'est pas maintenu constant.

Concentration en glucose oxydase $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$; tampon phosphate de potassium $0,01 \text{ M}$, pH initial 6,7.

En conclusion, afin d'oxyder à 95 % une solution de glucose 0,35M (6,5 %) à 40°C, la concentration en glucose oxydase étant 0,2 mg.ml⁻¹, un temps de résidence de 500 minutes est nécessaire. Afin d'oxyder une solution de glucose 2 M (36 %) le calcul montre qu'il faudrait un temps de résidence de 30 000 minutes environ (500 heures). A l'appui de ces résultats, il semble donc que ce type de réaction se prête mal à une opération en continu conforme aux exigences industrielles : ceci est dû essentiellement à ce que ce type d'enzyme nécessite deux substrats dont l'un est en concentration faible dans le milieu réactionnel.

La transformation continue du saccharose en acide gluconique et en fructose ne semble pas pouvoir être réalisée d'une façon industriellement intéressante. Signalons cependant qu'un procédé de séparation de l'acide gluconique par électrodialyse a été mis au point (WALON, 1969). Remarquons qu'il serait intéressant d'étudier également la réaction séquentielle provoquée par le système bienzymatique invertase-glucose isomérase sur le même substrat initial, le saccharose. Le fructose obtenu en fin de réaction possède de nombreuses applications alimentaires (WARDROP, 1971).

R E S U M E

Le but de ce travail a été de réaliser des modèles de réacteurs enzymatiques continus, d'en étudier les caractéristiques et d'en optimiser les conditions de fonctionnement - le type de réacteur a été choisi soit en fonction du type de rétention (enzyme soluble dans un réacteur continu homogène, enzyme immobilisée sur particules insolubles dans un réacteur tubulaire), soit en fonction du type de réaction (un réacteur homogène, par exemple, mais non un réacteur tubulaire, permet de maintenir le pH si celui-ci évolue au cours de la réaction).

L'hydrolyse continue de solutions de saccharose par de l'invertase de levure a été étudiée dans un réacteur homogène limité par une membrane d'ultrafiltration capable de retenir sélectivement l'enzyme.

Une étude préalable de la cinétique d'hydrolyse discontinue du saccharose et de la stabilité de l'invertase a été faite dans des conditions applicables à un procédé continu, et à concentration élevée en saccharose.

Des essais d'ultrafiltration ont indiqué que diverses membranes retiennent sélectivement l'invertase et laissent passer librement le reste des solutions de saccharose hydrolysé. Un débit maximum de produits d'hydrolyse est obtenu avec une solution de concentration proche de 50 %.

Des essais d'hydrolyse continue sans rétention d'enzyme ont montré que le taux stationnaire d'hydrolyse de mélange réactionnel peut être calculé à partir de l'expression cinétique de la réaction enzymatique discontinue et du bilan de matière d'un réacteur chimique continu.

Les essais d'hydrolyse continue avec rétention d'enzyme par ultrafiltration ont montré que la réutilisation de l'invertase, pendant 5 jours, à 50° C, ne provoque pas de perte notable de l'activité enzymatique. Dans les conditions adoptées, le taux d'hydrolyse reste constant, et proche de 90 %.

L'hydrolyse continue de solutions de saccharose par de l'invertase de levure a ensuite été étudiée dans un réacteur tubulaire dans lequel l'enzyme est retenue par adsorption sur une résine échangeuse d'ions.

Des essais d'adsorption de l'invertase ont montré qu'un maximum

de 4000 unités d'activité enzymatique peut être adsorbé ^{par gramme/} sur la résine Amberlite IRA 93 - et que le rendement d'activité (unités d'activité enzymatique adsorbée par rapport aux unités d'activité enzymatique utilisées lors de l'adsorption) peut atteindre 50 % lorsque l'activité enzymatique adsorbée est égale à 1600 unités. Aucune désorption n'est observée lors de lavages prolongés à 30° C avec du tampon acétate de sodium 0,01 M pH 5 ; la désorption devient progressivement plus importante lorsque la température et la molarité du tampon s'élèvent ; la désorption n'est que peu modifiée lorsque le pH du tampon est égal à 3 ou à 5. Le pH optimum d'activité des complexes invertase résine varie entre 3,2 (IRA 93) et 5,1 en fonction du caractère anionique ou cationique de la résine.

La cinétique d'hydrolyse du saccharose par le complexe invertase - résine IRA 93 suit une cinétique de premier ordre par rapport à la concentration en substrat, comme dans le cas de l'invertase soluble, le taux d'hydrolyse à la sortie du réacteur tubulaire a été déterminé expérimentalement en fonction du temps de résidence. Il n'a pas été possible de prévoir ce taux d'hydrolyse par le calcul faisant intervenir l'expression cinétique de la réaction et le bilan matière du réacteur continu. Ceci s'explique probablement par l'hétérogénéité de la catalyse et l'influence des phénomènes de diffusion sur la vitesse de réaction.

Les essais d'hydrolyse continue de saccharose avec rétention d'enzyme par adsorption ont montré qu'à 30°, la réutilisation de l'invertase ne provoque pas de perte notable d'activité enzymatique. Dans les conditions adoptées (notamment concentration en saccharose de 50 %) le taux d'hydrolyse reste constant pendant 8 jours et proche de 76 %. Ceci montre que l'invertase n'est pas désorbée.

Nous avons tenté de comparer les performances du réacteur tubulaire (adsorption) et du réacteur homogène (ultrafiltration) vis à vis de solutions de saccharose de concentrations élevées et identiques. Cette comparaison est fonction de la grandeur de référence sur laquelle celle-ci est établie. Mais d'une façon générale plus le taux d'hydrolyse en sortie de réacteur est proche de l'unité plus l'efficacité du réacteur tubulaire, comparée à celle du réacteur homogène à membrane d'ultrafiltration, est élevée. Une comparaison plus approfondie ainsi que l'évaluation de la fiabilité et de la rentabilité de ces deux réacteurs exigeraient la connaissance de données qui sortent du cadre de cette étude.

L'oxydation continue du glucose par de la glucose oxydase et de la catalase a été étudiée dans un réacteur homogène.

La cinétique et les conditions optimales d'oxydation du glucose ont été étudiées comme dans le cas de l'hydrolyse du saccharose par l'invertase. La cinétique de réaction (d'ordre zéro par rapport à la concentration en glucose lorsque celle-ci est très grande par rapport au K_M) permet de déterminer de façon simple la courbe de pH dépendance de la glucose oxydase. La vitesse d'oxydation est extrêmement faible par rapport à celle de l'hydrolyse du saccharose.

L'évaluation de la concentration en oxygène dissous dans le milieu réactionnel a été faite en déterminant la quantité de glucose oxydé d'une solution, en présence de glucose oxydase et de catalase, dans un système clos vis à vis de l'oxygène. Les coefficients de facilité de transfert d'oxygène ont été calculés après évaluation de la vitesse de réaction correspondant à une concentration infinie en glucose oxydase par rapport à l'oxygène. La valeur trouvée ($6 \cdot 10^{-4} M$) est en général supérieure à la concentration de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel : l'enzyme ne se trouve donc pas dans des conditions de vitesse maximale et c'est la concentration en oxygène qui constitue le facteur limitant de la vitesse de réaction.

Comme dans le cas de l'invertase, des essais d'oxydation continue du glucose sans rétention d'enzyme et avec régulation du pH ont montré que le taux de conversion du mélange réactionnel peut être calculé à partir de l'expression cinétique de la réaction enzymatique discontinue et du bilan de matière d'un réacteur chimique continu.

BIBLIOGRAPHIE

AIBA, S., HUMPREY, A.E. et MILLIS, N.F.,
(1965), Biochemical Engineering, Academic Press, New York.

ANDERSEN, B.,
(1967), Acta Chem. Scand., 21, 828.

ARNOLD, W.N.,
(1966), Arch. Biochem. Biophys., 113, 451.

AVRAMEAS, S., BROUN, G., SELEGNY, E. et THOMAS, D.,
(1968), Fr. Pat. C.N.R.S., n° 146, 205.

AXEN, R. et PORATH, J.,
(1966), Nature, 210, 367.

BAR ELI, A. et KATCHALSKI, E.,
(1963), J. Biol. Chem., 238, 1960.

BARMAN, T.E.,
(1969), Enzyme Handbook, Vol. 1, p. 112,
Springer-Verlag, New York.

BARNETT, L.B. et BULL, H.B.,
(1959), Biochim. Biophys. Acta, 35, 244.

BASEER, A. et SHALL, S.,
(1971), Int. J. Biochem., 2, 503.

BOWSKI, L., SAINI, R., RYU, D.Y. et VIETH, W.R.,
(1971), Biotechnol. Bioeng., 13, 641.

BRODIE, A.F. et LIPMANN, F.,
(1955), J. Biol. Chem., 212, 677.

BROUN, G., SELEGNY, E., AVRAMEAS, S. et THOMAS, D.,
(1969), Biochim. Biophys. Acta, 185, 260.

CHANG, T.M.S.,
(1964), Science, 146, 524.

- CHAPPELLE, E.W., RICH, E. et MAC LEOD, N.H.,
(1967), Science, 155, 1287.
- CHARM, G.E. et MATTEO, C.C.,
(1971), Methods in Enzymology, 22, 476.
- COLLINS, F.W. et CHANDORKAR, K.R.,
(1971), J. Chromatogr., 56, 163.
- CONSTANTINIDES, A., MYLES, S.J. et VIETH, W.R.,
(1972), Enzymologia, 43 (2), 121.
- QUATRECASAS, P. et ANFINSEN, C.B.,
(1971), Methods in Enzymology, 22, 345.
- DANNO, G.,
(1971), Agr. Biol. Chem., 35 (7), 997.
- DEMAIN, A.L.,
(1971), Methods in Enzymology, 22, 86.
- DIXON, M. et WEBB, E.C.,
(1958), Enzymes, Longmans, 2nd ed., p. 155.
- EDELMAN, J.,
(1964), Biochem. J., 57, 22.
- ENZASYL, Information bulletin, Koch-Light Lab. Ltd.,
(1968), Colnbrook, England.
- FAITH, J.T., NEUBERK, O.E. et WOOD, E.T.,
(1971), Adv. Biochem. Eng., 1, 77.
- FILIPPON, H. et HURNBY, W.E.,
(1970), Biochem. J., 120, 215.
- FISCHER, E.H. et KOHTES, L.,
(1951), Helv. Clin. Acta, 135, 1123.
- FISCHER, E.H., KOHTES, L. et FELLIG, J.,
(1951), Helv. Clin. Acta, 137, 1132.

GASCON, S., NEUMANN, N.P. et LAMPEN, J.O.,
(1968), J. Biol. Chem., 243, 1567.

GASCON, S., LAMPEN, J.O. et NEUMANN, N.P.,
(1968), J. Biol. Chem., 243, 1573.

GELLF, G.,
(1971), Thèse de 3ème cycle (ROUEN).

GIBSON, Q.H., SWOBODA, B.E.P. et MASSEY, V.,
(1964), J. Biol. Chem., 239 (11), 3927.

GHOSH, A., JANIC, V. et SLOVITER, H.A.,
(1970), Anal. Biochem., 38, 270.

GOLDMAN, R., KEDEM, O., SILMAN, I.H., CAPLAN, S.R. et KATCHALSKI, E.,
(1968), Biochemistry, 7, 486.

GOLDSTEIN, L., LEVIN, Y. et KATCHALSKI, E.,
(1964), Biochemistry, 3, 1913.

GOLDSTEIN, L. et KATCHALSKI, E.,
(1968), Anal. Chem., 234, 375.

GUILBAULT, G.G. et KRAMER, D.N.,
(1965), Anal. Chem., 37, 1675.

GRYSZKIEWICZ, J.,
(1971), Folia Biologica, 19 (1), 119.

HICKS, G.P., UPDIKE, S.J.,
(1966), Anal. Chem., 38, 726.

HOIEH, D.P.H., SILVER, R.S. et MATELES, R.I.,
(1969), Biotechnol. Bioeng., 11, 1.

HODGMAN, E.C., WEAST, R.C. et SELBY, S.M.,
(1957), Handbook of Chemistry and Physics, 39th ed., p. 1607,
Chemical Rubber Publishing Co, Cleveland, U.S.A.

KAY, G. et CROOK, E.M.,
(1967), Nature, 216, 514.

KEILIN, D. et HARTREE, E.F.,
(1948), Biochem. J., 42, 221.

KLADKO, M.,
(1971), Chem. Tech., 3, 141.

KLEPPE, K.,
(1966), Biochemistry, 5 (1), 139.

KOBAYASHI, T. et MOO-YOUNG, M.,
(1971), Biotechnol. Bioeng., 13, 893.

LACHMANN, A.,
(1972), Food Engineering, 44, 74.

LE GOFF, P.,
(1968), Encyclopaedia Universalis, Vol. 7, p. 561.

LEVENSPIEL, O.,
(1967), Chemical Reaction Engineering, 5ème Ed., pp. 242-308,
John Wiley and Sons, Inc., New York.

LILLY, M.D., HORNBY, W.E. et CROOK, E.M.,
(1966), Biochem. J., 100, 713.

LILLY, M.D. et SHARP, A.K.,
(1967), Meeting of the London and South Eastern Branch of The
Institution of London.

LILLY, M.D. et DUNNILL, P.,
(1971), Process. Biochemistry, 6 (3), 29.

LILLY, M.D.,
(1972), Symposium on chemically grafted and cross-linked proteins,
Rouen, September 15-16.

LINEWEAVER, M. et BURK, D.,
(1934), J. Am. Chem. Soc., 56, 658.

LAC LAREN, A.D.,
(1963), Enzymologia, 25, 1.

MAC MULLIN, R.B. et WEBER, M.,
(1935), Trans. Amer. Inst. Chem. Eng., 31, 409.

MASON, R.D. et WEETALL, H.H.,
(1972), Biotechnol. Bioeng., 14, 637.

MAY, O.E., WEISBERG, S.M. et HERRICK, H.T.,
(1929), J. Wash. Acad. Sci., 19 (20), 443.

MITZ, M.A.,
(1956), Science, 123, 1076.

MITZ, M.A. et SCHLUETER, R.J.,
(1959), J. Am. Chem. Soc., 81, 4024.

MITZ, M.A. et SUMMARI, L.J.,
(1961), Nature, 189, 576.

MIYAMOTO, K., FUJII, T. et MIURA, Y.,
(1971), J. Ferm. Technol., 49 (6), 565.

MONSAN, P. et DURAND, G.,
(1971), C.R. Acad. Sc. Paris, 273, 33.

NAKAMURA, S. et OGURA, Y.,
(1962), J. Biochem., 52, 214.

NEGORO, H.,
(1970), J. Ferm. Technol., 48, 689.

NELSON, J.M. et HITCHOCK, D.J.,
(1921), J. Am. Chem. Soc., 43, 1956.

NELSON, J.M.,
(1933), Chemical Reviews, 12, 1.

NEUMANN, N.P. et LAMPEN, J.O.,
(1967), Biochemistry, 6, 468.

NICOL, M.J. et DUKE, F.R.,
(1966), J. Biol. Chem., 241 (18), 4292.

- O'MALLEY, J. et WEAVER, J.,
(1972), *Biochemistry*, 11 (19), 3527.
- O'NEILL, S.P., DUNNILL, P. et LILLY, M.D.,
(1971), *Biotechnol. Bioeng.*, 13, 337.
- O'NEILL, S.P., WYKES, J.R., DUNNILL, P. et LILLY, M.D.,
(1971), *Biotechnol. Bioeng.*, 13, 319.
- PAZUR, J.H., KLEPPE, K. et BALL, E. M.,
(1963), *Arch. Biochem. Biophys.*, 103, 515.
- PAZUR, J.H. et KLEPPE, K.,
(1964), *Biochemistry*, 3, 578.
- REED, G.,
(1966), *Enzymes in Food Processing*, 2ème Ed., Academic Press, New York.
- REESE, E.T. et MANDELIS, M.,
(1958), *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 4626.
- RUCHTI, J. et MAC LAREN, A.D.,
(1964), *Enzymologia*, 27, 185.
- SAINI, R., WIETH, W.R. et WANG, S.S.,
(1972), *Trans. N.Y. Acad. Sc.*, 34 (8), 664.
- SCHNEIDER, H.G.,
(1971), *International Sugar J.*, 73, 69 et 100.
- SHULER, M.L., ARIS, R. et TSUCHIYA, H.M.,
(1972), *J. Theor. Biol.*, 35, 67.
- SILMAN, I.H. et KATCHALSKI, E.,
(1965), *Annual Rev. Biochem.*, 35 (11), 873.
- SMILEY, K.L.,
(1971), *Biotechnol. Bioeng.*, 13, 309.
- STRANBERG, G.W. et SMILEY, K.L.,
(1971), *Applied Microbiology*, 21 (4), 588.

SUZUKI, H., OZAWA, Y. et MAEDA, H.,
(1966), Agr. Biol. Chem. (Tokyo), 30, 807.

SWOBODA, B.E.P. et MASSEY, V.,
(1965), J. Biol. Chem., 240, 2209.

THOMAS, D., BROUN, G. et SELEGNY, E.,
(1972), Biochimie, 54 (2), 229.

WAHEED, A. et SHALL, S.,
(1971), Biochim. Biophys. Acta, 242, 173.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
MATERIELS ET METHODES.....	5
CHAPITRE I	
HYDROLYSE CONTINUE DU SACCHAROSE PAR DE L'INVERTASE DE LEVURE RETENUE SOUS FORME SOLUBLE DANS UN REAC- TEUR A MEMBRANE D'ULTRAFILTRATION.....	11
- Influence des conditions de réactions sur la cinétique d'hydrolyse et sur la stabilité de l'enzyme.....	12
- Ultrafiltration de solutions d'invertase et de solutions de saccharose hydrolysé.....	17
- Hydrolyses continues.....	20
CHAPITRE II	
HYDROLYSE CONTINUE DU SACCHAROSE PAR DE L'INVERTASE IMMOBILISEE PAR ADSORPTION DANS UN REACTEUR TUBULAIRE...	26
- Adsorption de l'invertase sur les particules de résines échangeuses d'ions.....	26
- Propriétés de l'invertase adsorbée.....	35
- Hydrolyses continues en réacteur tubulaire.....	42
CHAPITRE III	
OXYDATION CONTINUE DU GLUCOSE A L'AIDE DE LA GLUCOSE OXYDASE.....	49
- Influence des conditions de réaction sur la ci- nétique d'oxydation.....	50
- Oxydations continues du glucose en réacteur homo- gène.....	56
RESUME.....	75
BIBLIOGRAPHIE.....	78

Vu et permis d'imprimer
Montpellier, le
Le Président de l'Université
des Sciences et Techniques
du Languedoc.

